

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO**  
**Facoltà di Medicina e Chirurgia**  
**Scuola di dottorato di Biotecnologie applicate alle Scienze**  
**Mediche**  
**XXIV ciclo**



**ANALISI MOLECOLARE E FUNZIONALE DI**  
**NUOVE VARIANTI PATOGENETICHE E**  
**IDENTIFICAZIONE DI NUOVI GENI CANDIDATI**  
**NELLA PIU' VASTA CASISTICA ITALIANA DI**  
**IPOGONADISMO IPOGONADOTROPO E**  
**SINDROME DI KALLMANN**

**Relatore: Chiar.mo Prof. Luca PERSANI**

**Correlatore: Dott. Marco BONOMI**

**DOMENICO VLADIMIRO**

**LIBRI**

**Matricola Nr: R08098**

**Anno Accademico 2010-2011**

## Sommario

<i>Riassunto</i> .....	5
<i>Introduzione</i> .....	9
GENETICA DELL'ICH .....	14
KAL1.....	15
FGFR1 e FGF8 .....	16
HS6ST1.....	19
TAC3 e TAC3R.....	20
KISS1 e KISS1R .....	22
GnRH e GnRHR .....	24
CHD7.....	26
NELF .....	26
EBF2.....	26
PROKR2 e PROK2 .....	27
MONOGENICITA', DIGENICITA' ED OLIGOGENICITA' .....	29
<i>Scopo</i> .....	31
<i>Materiali e Metodi</i> .....	33
CASISTICA.....	34
ESTRAZIONE DEL DNA.....	34
PCR (Polimerase Chain Reaction) .....	35
ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO .....	36
PURIFICAZIONE DEL FRAMMENTO AMPLIFICATO .....	36
REAZIONE DI SEQUENZA .....	37
SEQUENZIATORE E ANALISI DELLE SEQUENZE.....	38
SUBCLONAGGIO.....	39
PCR DI MUTAGENESI .....	40
DIGESTIONE ENZIMATICA PER SUBCLONAGGIO .....	41
PURIFICAZIONE DA GEL D'AGAROSIO .....	42
LIGAZIONE.....	42
PRECIPITAZIONE DEL DNA.....	43
TRASFORMAZIONE DELLE CELLULE BATTERICHE .....	43
PREPARAZIONE DEI BATTERI ELETTROCOMPETENTI .....	43

TRASFORMAZIONE PER ELETTROPORAZIONE .....	43
SCREENING DEI CLONI LIGATI .....	44
PCR SUL MEDIUM DI CULTURA BATTERICA.....	44
MINIPREP .....	44
SCREENING PER SEQUENZIAMENTO.....	45
MAXIPREP .....	45
CREAZIONE DEI PLASMIDI MUTANTI.....	46
MUTAGENESI SITO SPECIFICA.....	47
PCR DI MUTAGENESI.....	47
DIGESTIONE ENZIMATICA CON DpNI .....	48
SCREENING DEI CLONI MUTATI PER DIGESTIONE ENZIMATICA.....	49
SUBCLONAGGIO.....	49
STUDI FUNZIONALI.....	50
COLTURE CELLULARI .....	50
TRANSFEZIONE CON LIPOFECTAMINA .....	50
FACS.....	51
PERMEABILIZZAZIONE .....	52
QUANTIZZAZIONE DEL cAMP.....	53
CURVE CONCENTRAZIONE EFFETTO.....	53
DOSAGGIO DEL cAMP.....	53
QUANTIZZAZIONE DELL'IP1 .....	55
CALCOLO DELLO SCORE FUNZIONALE .....	57
HOMOLOGY MODELLING DI PROKR2.....	57
SNPs E CNVs GENOTYPING.....	57
PREPARAZIONE DEI CAMPIONI ED IBRIDAZIONE SU CHIP ILLUMINA®.....	57
CONTROLLO DI QUALITA' DEI DATI .....	58
Q-Q PLOT .....	60
IDENTIFICAZIONE E COMPARAZIONE DEI CNVs.....	60
ANALISI LOH ( <i>Loss Of Heterozygosity</i> ) .....	61
ANALISI SNPs .....	61
<i>Risultati</i> .....	62

<b>CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DI MUTAZIONI A CARICO DEL GENE PROKR2: BLOCCO IN DUE DIFFERENTI VIE DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE .....</b>	<b>63</b>
<b>ANALISI BIOINFORMATICA DELLE VARIANTI GENETICHE INDIVIDUATE NEL GENE PROKR2.....</b>	<b>66</b>
<b>STUDI FUNZIONALI.....</b>	<b>67</b>
<b>FACS ANALISI: valutazione dell'espressione in membrana .....</b>	<b>67</b>
<b>CURVE CONCENTRAZIONE-EFFETTO PER IP1 .....</b>	<b>69</b>
<b>CURVE CONCENTRAZIONE-EFFETTO PER cAMP.....</b>	<b>70</b>
<b>SAGGI FUNZIONALI: ESPRESSIONE, IP1 e cAMP.....</b>	<b>72</b>
<b>GENOTIPIZZAZIONE DI SNPs E CNVs IN PAZIENTI CON IPOGONADISMO CENTRALE IDIOPATICO. UN APPROCCIO ALTERNATIVO PER IDENTIFICARE NUOVI GENI CANDIDATI.....</b>	<b>74</b>
<b>ANALISI DEGLI SNPs .....</b>	<b>75</b>
<b>ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI.....</b>	<b>75</b>
<b>TEST DI ASSOCIAZIONE SUL GENOTIPO.....</b>	<b>76</b>
<b>ANALISI DEI CNVs .....</b>	<b>81</b>
<b>ANALISI GLOBALE DEI CNVs.....</b>	<b>81</b>
<b>ANALISI LOCUS-SPECIFICA DEI CNVs .....</b>	<b>82</b>
<b>ANALISI DELLE REGIONI LOH .....</b>	<b>86</b>
<b>ALTERAZIONI CARIOTIPICHE.....</b>	<b>90</b>
<b>PATHWAY DISCOVERY .....</b>	<b>91</b>
<i>Discussione.....</i>	<b>95</b>
<b>SAGGI FUNZIONALI DELLE VARIANTI DI PROKR2 .....</b>	<b>96</b>
<b>ANALISI GLOBALE .....</b>	<b>99</b>
<b>ANALISI microRNA .....</b>	<b>102</b>
<b>SNPs .....</b>	<b>102</b>
<b>CNVs .....</b>	<b>103</b>
<b>LOH .....</b>	<b>104</b>
<i>Bibliografia .....</i>	<b>111</b>

# *Riassunto*

L'ipogonadismo centrale idiopatico (*Idiopathic Central Hypogonadism* = ICH) è una patologia rara con una forte componente genetica, nella quale disfunzioni a livello ipotalamico o ipofisario, che coinvolgono la maturazione e/o la funzione del neurone GnRH, causano un ridotta o assente funzionalità delle gonadi. Questa patologia può presentarsi in associazione a iposmia o anosmia, (Sindrome di Kallmann, KS) o a un normale senso dell'olfatto (ipogonadismo normosmico, nIHH) e si manifesta con una estrema variabilità fenotipica. Nonostante l'identificazione di 14 geni implicati nella patogenesi di questa patologia, circa il 70% dei casi di ICH rimane idiopatico. Tra i geni causativi, un ruolo di particolare importanza lo ricopre la pathway delle prokineticine, in particolare la prokineticina2 (PROK2) e il suo recettore (PROKR2). Infatti in circa il 10% dei casi di ICH è possibile identificare una variante genetica in uno di questi due geni quali evento causale della patologia. Il recettore PROKR 2 appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR). La sua attivazione, attraverso il legame con PROK2, determina l'attivazione delle proteine  $G_q$ ,  $G_i$  e  $G_s$ , ed una conseguente produzione di IP<sub>3</sub>, di cAMP e la mobilitazione del calcio intracellulare. Ad oggi in letteratura sono state descritte 27 mutazioni a carico di PROKR2 e gli studi funzionali effettuati su una minoranza di esse hanno valutato esclusivamente gli effetti sulla via  $G_q$ -IP<sub>3</sub>. Tuttavia un numero crescente di lavori nell'ambito dei GPCRs dimostra l'importanza dello studio funzionale di tutte le possibili vie di attivazione di un singolo recettore al fine di interpretare al meglio le conseguenze funzionali di varianti genetiche identificate.

Nel presente lavoro di tesi abbiamo sviluppato due principali filoni di ricerca partendo dalla disponibilità della più vasta casistica italiana di pazienti ICH.

Nella prima parte della tesi abbiamo condotto studi di screening genetico dei pazienti della casistica, valutando i principali geni causali noti, tra cui PROKR2. Le varianti genetiche identificate in PROKR2 sono quindi state caratterizzate da un punto di vista funzionale per testarne il loro potenziale patogenetico. Lo screening di 217 pazienti ha permesso di individuare sette varianti missenso di PROKR2 (V158I, L173R, T260M, R268C, V274D, V331M e V334M), di cui 3 non ancora descritte in letteratura; oltre a 2 varianti nonsense (15fsX45, 20fsX43). Le varianti individuate sono state inserite mediante mutagenesi sito-specifica in vettori SPRT-PROKR2-pcDNA3, caratterizzati dalla presenza di una tag di rodopsina al N-terminale del recettore. Ciò permette la visualizzazione della localizzazione cellulare dei mutanti attraverso il legame con un anticorpo anti-rodopsina. I costrutti così generati sono stati trasfettati in cellule HEK 293 e CHO per i successivi studi funzionali. L'analisi al FACS ha evidenziato come tutte le varianti abbiano una ridotta espressione in membrana (riduzione del 11-55%), ad eccezione della mutazione V334M, che mostra

una espressione leggermente eccedente quella del *wt*. Sono poi stati eseguiti saggi funzionali con la generazione di curve concentrazione-effetto sia per IP1 che per cAMP. I risultati ottenuti mostrano come le mutazioni T260M, R268C, V274D, V331M e V334M causino una forte riduzione del segnale mediato dalla proteina G<sub>q</sub>, mentre il segnale del cAMP mediato dalla proteina G<sub>s</sub> viene notevolmente ridotto nei mutanti L173R e V334M. Le mutazioni V274D e V334M sono invece caratterizzate da una marcata inattivazione di entrambe le vie. Analizzando, infine, il modello per omologia di PROKR2 appare evidente che la variante V331M è localizzata a livello di un dominio altamente conservato (il motivo NPXXY), coinvolto nella trasduzione del segnale. Questi sono i primi esperimenti che analizzano entrambe le vie di trasduzione attivate dal recettore PROKR2 e che mostrano come le diverse varianti associate all'ICH possano influire sulle vie di trasduzione del segnale in maniera molto variabile. In particolare, alcune varianti causano un'incapacità di stimolare una delle due vie, suggerendo così che l'integrità di entrambe sia necessaria per un normale sviluppo e funzionamento dei neuroni GnRH-secernenti.

La seconda parte del presente lavoro di tesi, è invece stata volta a chiarire ulteriormente i meccanismi genetici (ed eventualmente epigenetici) alla base dell'eziopatogenesi dell'ICH. Per condurre questi studi ci siamo avvalsi delle tecniche di SNP e CNV *genotyping*, su una casistica selezionata di casi familiari di ICH. Per ciascun paziente sono stati analizzati 660.000 SNPs e 100.000 CNVs, confrontandoli successivamente con un vasto database di controlli apparentemente sani in nostro possesso, in un'analisi di tipo caso/controllo. Le analisi effettuate si sono focalizzate sull'identificazione di SNP e sulla presenza di CNV significativamente correlati con l'ICH e su un'analisi di tipo familiare per vaste zone di omozigosità nei pazienti affetti (*Loss of Heterozigosity regions* = LOH). Una prima analisi macroscopica dei dati ottenuti mostra che il numero e l'ampiezza delle delezioni in singola copia sia significativamente maggiore nei casi di ICH, rispetto ai relativi controlli. L'analisi degli SNPs e dei CNVs ha evidenziato, fra i 30 loci identificati, quattro geni (CNTNAP2, GPC, RAB39B e PPFIA2) che per espressione e funzione molecolare sembrano essere dei buoni candidati da analizzare per sequenziamento diretto nella casistica ICH. Inoltre sono stati identificati tre cluster di microRNA (mir4275, mir507/508/509, mir320D2), suggerendo per la prima volta un potenziale coinvolgimento di queste molecole nella patogenesi dell'ICH. Analizzando invece i geni che risiedono in zone LOH, è possibile osservare un arricchimento per alcuni pathway o famiglie di proteine, quali: il pathway degli FGFR; caderine e molecole di adesione cellulare (CAM); recettori e ligandi coinvolti nei processi di differenziamento del sistema nervoso centrale (CNS), dell'ipotalamo e

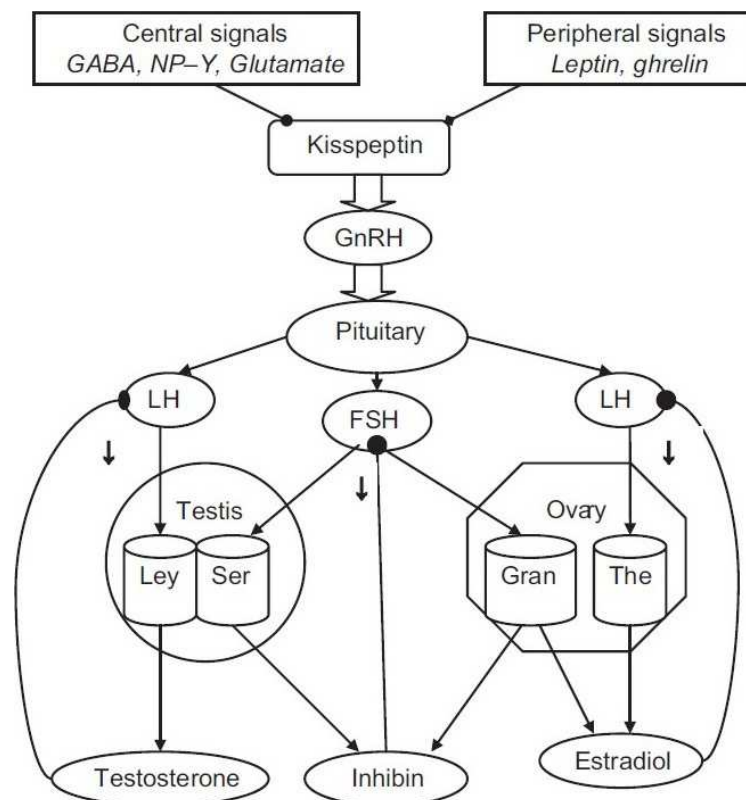
dell'ipofisi; geni associati a difetti della linea mediana; Geni associati alla sindrome di Prader-Willi e sindrome di Angelmann; plexine e proteine RAB.

In conclusione questo costituisce il primo lavoro in cui un approccio genome-wide, viene utilizzato per l'identificazione di nuovi geni candidati per la patogenesi dell'ICH. I dati preliminari ottenuti, andranno riconfermati ampliando la casistica dei pazienti analizzati e tramite sequenziamento diretto dei geni identificati quali potenziali geni causativi, ma forniscono forti indizi relativi al coinvolgimento di nuovi pathway coinvolti nell'ipogonadismo centrale idiopatico.



# *Introduzione*

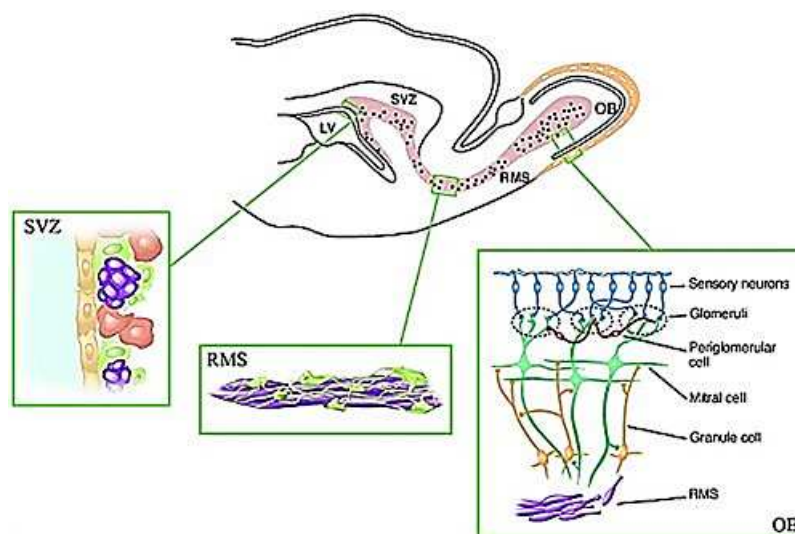
L'ipogonadismo centrale idiopatico (ICH) è una patologia caratterizzata da una ridotta funzionalità delle gonadi (testicolo e ovaio) conseguente a una loro ipostimolazione da parte di ipotalamo e/o ipofisi. Nella normale fisiologia dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG) la produzione dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) da parte dell'ipotalamo determina la stimolazione delle cellule ipofisarie gonadotropino-secerenti a produrre le due gonadotropine (LH, ormone luteinizzante; FSH, ormone follicolo-stimolante) che a loro volta giungono in periferia a livello delle gonadi e inducono la produzione degli ormoni sessuali (Te, testosterone; E<sub>2</sub>, estradiolo) e la produzione/maturazione di spermatozoi e ovociti. L'asse HPG, così come tutti gli altri assi endocrini ipotalamo-ipofisari, è finemente regolato da un meccanismo di feedback che garantisce una regolare produzione di Te ed E<sub>2</sub> (vedi Figura 1).



**Figura 1:** sistema ipotalamo-ipofisi-gonadi di secrezione pulsatile del GnRH (Bajpai and Menon, 2011)

Nell' ICH si ha una ridotta produzione di ormoni sessuali (Te/E<sub>2</sub>) associata a una mancato rialzo dei livelli di LH/FSH che risultano invece ridotti o inappropriatamente normali a testimonianza del danno originario in sede ipotalamica o ipofisaria. L'ICH può essere congenito o acquisito presentando rispettivamente un quadro di mancato o ritardato sviluppo sessuale alla pubertà o una variabile compromissione del sistema riproduttivo e della sessualità in età post-

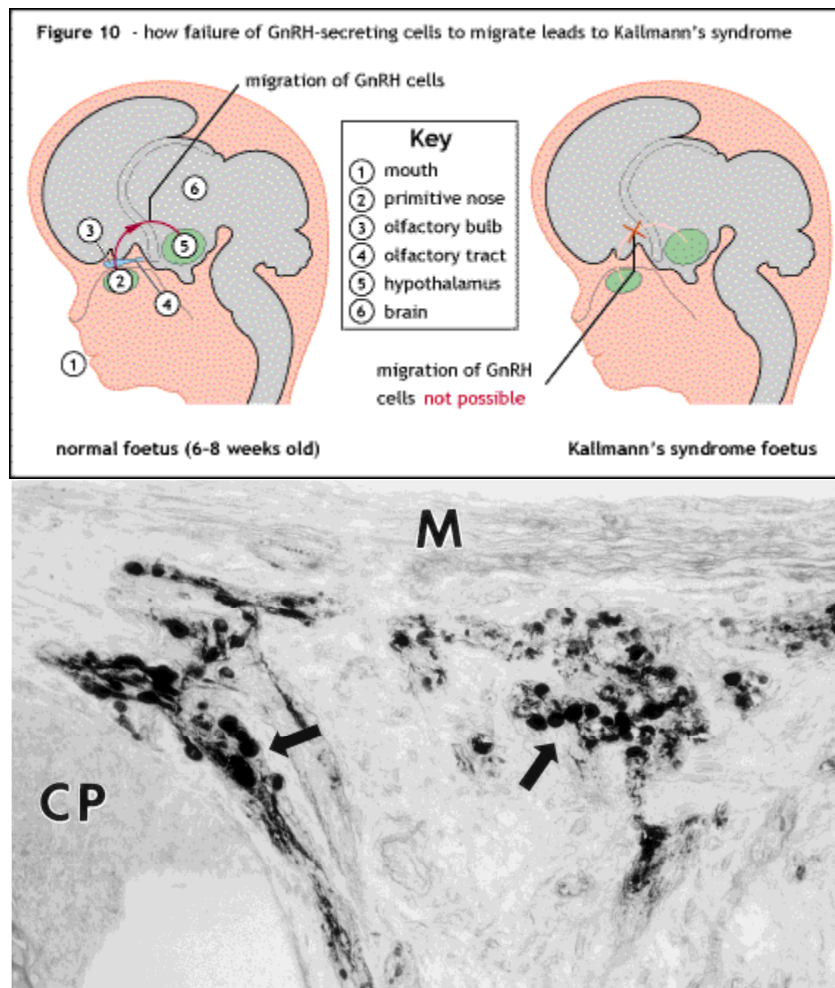
puberale. Inoltre l'ICH può clinicamente associarsi o meno ad una disfunzione di vario grado del sistema olfattivo, identificando rispettivamente la Sindrome di Kallmann (SK= ICH e ipo-anosmia) o ICH normosmico (nICH). Il deficit congenito isolato di gonadotropine ha un'incidenza stimata di 1:8-10.000 nei maschi e 1:40.000 nelle femmine e può essere sporadico o familiare (nel 20-30% dei casi). La definizione di IC idiopatico è legata alla difficoltà di identificare le cause specifiche responsabili di questi difetti ormonali. Ciò è dovuto alla rarità della malattia, alla scarsa diffusione familiare (anche per la compromissione della capacità riproduttiva), alla variabilità o sovrapposizione dei fenotipi. Il primo difetto genetico individuato risale al 1991 e riguarda un gene denominato KAL-1 (Franco et al., 1991; Legouis et al., 1991). Questo gene codifica per una proteina chiamata Anosmina che è omologa alle proteine N-CAM di adesione neuronale e che è implicata nella migrazione dei neuroni GnRH-secernenti e nella morfogenesi dei bulbi olfattori. I neuroni GnRH-secernenti originano infatti in prossimità dell'epitelio olfattivo e migrano insieme ai neuroni olfattivi verso la sede definitiva dell'ipotalamo medio-basale (vedi Figura 2).



**Figura 2:** flusso di migrazione rostrale e struttura istologica dei bulbi olfattori. (Saghatelian et al., 2005)

L'alterazione alla base della SK è la compromissione di questo processo durante l'embriogenesi, come dimostrato da studi condotti su un feto umano di 19 settimane con manifestazioni anatomopatologiche da SK e delezione del braccio corto del cromosoma X (Schwanzel-Fukuda et al., 1989). In questo feto i neuroni GnRH-secernenti erano localizzati a livello del naso e i loro assoni erano bruscamente

interrotti a livello della lamina cribriforme, mentre i bulbi e i tratti olfattori erano assenti.



**Figura 3:** arresto di migrazione dei neuroni GnRH secernenti in un feto maschio con mutazione di KAL-1; CP= lamina cribriforme; M= meningi (Bajpai and Menon, 2011)

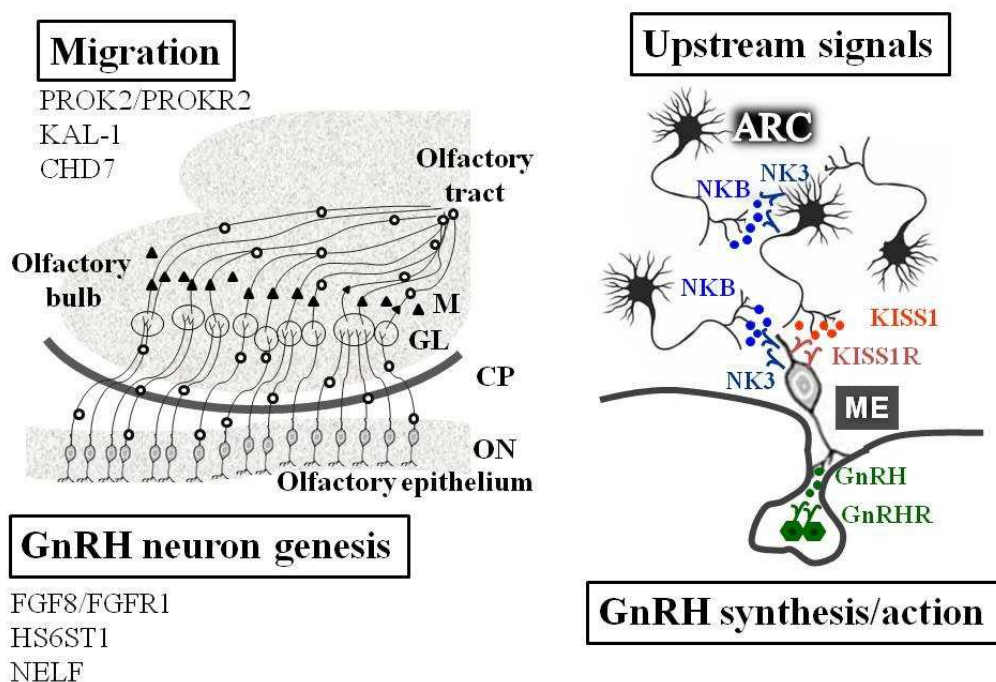
Ad oggi sono state descritte diverse mutazioni a carico di KAL1 in pazienti affetti da SK di tipo X-linked (Dode and Hardelin, 2009). Tuttavia le mutazioni di KAL-1 non danno ragione delle forme autosomiche, recessive e dominanti, di SK né tantomeno di nICI. Per tale ragione sono stati condotti numerosi altri studi genetici al fine di individuare nuove cause alla base di questi difetti ormonali. Nel 2003 è stato quindi descritto il coinvolgimento del gene FGFR-1, anche denominato KAL-2, nella patogenesi di SK (Dode and Hardelin, 2004) e in seguito anche di nICI (Pitteloud et al., 2006a). A seguire, in questi ultimi anni, grazie anche alla generazione di specifici modelli animali, sono stati descritti nuovi geni coinvolti nella patogenesi di entrambe le forme di ICI o singolarmente nella SK o nel nICI (vedi tabella 1).

<b>Gene</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Ereditarietà</b>	<b>Riferimento Bibliografico</b>
KAL1	KS	X-linked recessiva	(Franco et al., 1991) (Legouis et al., 1991)
FGFR1	KS, nIHH	AD AR	(Dode and Hardelin, 2004) (Pitteloud et al., 2006a)
FGF8	KS, nIHH	AD AR	(Falardeau et al., 2008)
PROK2	KS, nIHH	AD AR	(Dode et al., 2006)
PROKR2	KS, nIHH	AD AR	(Dode et al., 2006)
NELF	KS	AD	(Miura et al., 2004)
CHD7	Sindrome di Charge, KS	AD	(Kim et al., 2008)
GNRHR	nIHH	AR	(de Roux et al., 1997)
GNRH1	nIHH	AD AR	(Bouligand et al., 2009)
KISS1R	nIHH	AR	(Semple and Topaloglu, 2010a)
TAC3	nIHH	AR	(Topaloglu et al., 2009)
TAC3R	nIHH	AR	(Topaloglu et al., 2009)
HS6ST1	nIHH	AD AR	(Tornberg et al., 2011)

**Tabella 1:** geni coinvolti nell'eziopatogenesi dell'ipogonadismo centrale isolato

## GENETICA DELL'ICH

Ad oggi sono stati identificati 14 geni causativi per l'ICH come rappresentato in Figura 4.



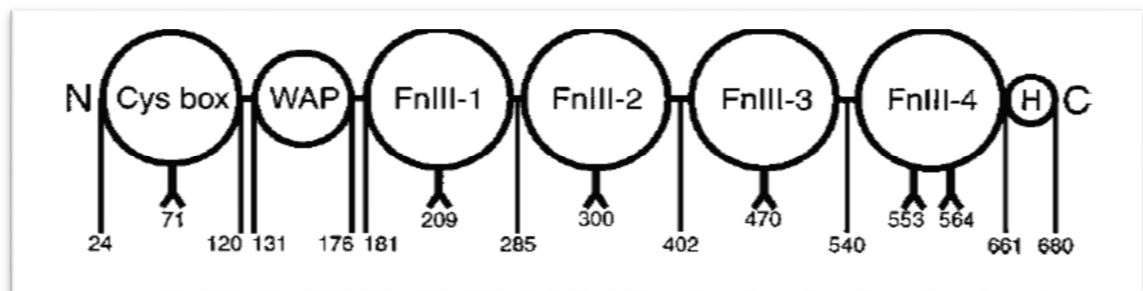
**Figura 4:** rappresentazione schematica dei processi fisiologici coinvolti nella patogenesi dell'ICH. (Bonomi et al., 2011)

Alcuni di questi geni sono determinanti per la corretta differenziazione durante il periodo embrionale dei neuroni GnRH-secernenti, come ad esempio il sistema recettore-ligando costituito da FGFR1/FGF8 (Recettore 1 dei fattori di crescita dei fibroblasti; fattore di crescita dei fibroblasti 8), NELF (fattore di rilascio dell'ormone LH embrionale nasale) e HS6HST1 (eparansolfato 6-O-sulfoniltransferasi). Altri geni invece codificano per i segnali essenziali per la corretta migrazione dei neuroni GnRH-secernenti dalla loro sede embrionale originaria (placode olfattorio) all'ipotalamo, come ad esempio il KAL-1, il sistema ligando-recettore PROK2/PROKR2 (Prokineticina 2 ed il suo recettore) e la CHD7 (*Chromodomain-helicase Dna Binding Protein* 7). Altri geni invece codificano per gli elementi di regolazione a monte dell'attivazione dei neuroni GnRH-secernenti, come le due coppie ligando-recettore formate dal TAC3/TACR3 (tachichinina 3 e il suo recettore chiamato

anche neurochinina B, NKB e neurochinina 3 (recettore, NK3) o il KISS1/KISS1R (Kisspeptina 1 e il suo recettore, precedentemente conosciuto come GPR54). Infine, naturalmente, fra i geni causativi dell'ICH vi sono il gene codificante per il GnRH (GnRH1) e per il suo recettore (GNRHR).

## KAL1

Il gene KAL1 (OMIM: 308700), situato nel cromosoma Xp.22.3, è formato da 14 esoni che codificano per una glicoproteina di matrice extracellulare di circa 100 kDa chiamata Anosmina-1. Questa proteina contiene una regione ricca in cisteina, un dominio delle proteine del siero del latte (WAP) e 4 domini di Fibronectina di tipo III (FnIII). (Franco et al., 1991; Legouis et al., 1991) I domini FnIII sembrano creare una superficie piatta con una forte carica basica, ciò consente l'interazione con l'anosmina-1 e le altre componenti della matrice extracellulare. (Hu et al., 2004; Soussi-Yanicostas et al., 1996) L'anosmina-1 è espressa durante la 5° settimana di gestazione, nel proencefalo, nell'area di contatto con le fibre olfattorio e sembra stimolare le proiezioni afferenti verso i bulbi olfattori. (Hardelin et al., 1999) Questo è probabilmente il motivo dell'associazione di mutazioni in tal gene con l'anosmia.



**Figura 5:** rappresentazione schematica dei domini strutturali dell'Anosmina-1. (Robertson et al., 2001)

Gli studi *post mortem* su un feto di 19 settimane con una delezione di KAL1 hanno fornito importanti indizi circa la sindrome di Kallmann *X-linked*, rivelando all'esame autoptico sia un'aplasia dei bulbi olfattori e un'anomala migrazione dei neuroni GnRH-secernenti che si sono differenziati nel placode olfattorio e che hanno iniziato a migrare ma si sono arrestate prima di arrivare nella loro sede finale nel sistema nervoso centrale (SNC). (Schwanzel-Fukuda et al., 1989) Sono stati descritti diversi tipi di varianti genetiche a carico di KAL1, fra le quali mutazioni missenso e non senso, mutazioni in siti di *splicing*, delezioni intrageniche e microdelezioni cromosomiche che coinvolgono l'intero gene KAL1. (Bianco and Kaiser, 2009) Le caratteristiche cliniche nei maschi con mutazioni in questo gene includono anosmia/iposmia. Inoltre nei pazienti con mutazioni in KAL1 spesso si aggiungono molti difetti non-riproduttivi e non-olfattori, quali difetti della linea facciale mediana

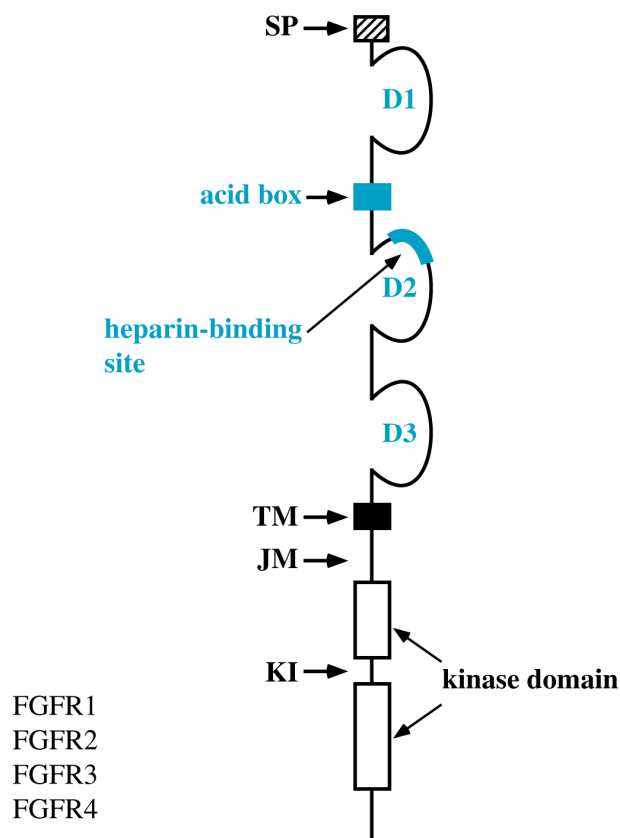


(labioschisi e/o palatoschisi), metacarpi di lunghezza ridotta, agenesia renale, difetti uditivi, sincinesie bimanuali, difetti oculomotori e atassia cerebrale. (Trarbach et al., 2007) Fra i sintomi descritti, quelli che mostrano le incidenze maggiori sono l'agenesia renale e le sincinesie bimanuali, che si presentano rispettivamente in circa il 30-40% e il 75% dei casi di sindrome di Kallmann. Mutazioni di KAL1 sono state identificate in circa il 60% dei casi di KS con familiarità, a suggerire che ci sia una ereditarietà di tipo X-linked e solo nel 10-15% dei maschi con KS sporadica. (Dode and Hardelin, 2004) Inoltre quasi tutte le mutazioni sono state identificate in pazienti con ICH e una disfunzione olfattoria variabile. Ad oggi, è stato descritto in letteratura un solo caso di mutazione di KAL1 associato a nICH. (Sato et al., 2004)

### FGFR1 e FGF8

Il gene FGFR1 (OMIM: 136350), chiamato anche KAL2, si trova sul cromosoma 8p12 e comprende 18 esoni. La proteina FGFR1 matura appartiene alla superfamiglia al recettore tirosina chinasi (RTK), che si compone di quattro sottotipi (FGFR1-4) e sette isoforme di FGFR, che si legano con specificità diverse ai 22 ligandi appartenenti alla famiglia dei fattori di crescita dei fibroblasti (FGF). L'FGFR1 è formato da tre loop extracellulari *immunoglobuline-like* (D1, D2 e D3), un dominio acido tra i due domini immunoglobulinici D1-D2 (la regione linker D1-D2 contiene una zona di aminoacidi carichi negativamente e un sito di *binding* per gli eparansolfati (HBS) vicino alla prima metà del D2), un dominio transmembrana e un dominio intracellulare tirosin-chinasico. (Groth and Lardelli, 2002) Lo *splicing* alternativo della seconda metà del dominio D3 genera due isoforme transmembrana, IIIb e IIIc. (Mohammadi et al., 2005) La tasca di legame per gli FGF è formata dai domini di membrana terminali D2-D3. L'isoforma D3 determina la specificità di legame per gli FGF, mentre il dominio D1 può ripiegarsi a interagire con il dominio D2 nel sito di binding con FGF e HS, fungendo così da potenziale auto-inibitore competitivo nell'interazione di FGFR con gli FGF e gli HS.





**Figura 6:** rappresentazione schematica dei domini strutturali dell'FGFR1. In evidenza i siti di legame per gli HPSG.

Il *signaling* di FGFR1 si ottiene da cambiamenti conformazionali del recettore a seguito dell'interazione col ligando, portando alla dimerizzazione e alla successiva autofosforilazione incrociata dei domini tirosin-chinasi intracellulari. Oltre al legame con i due FGF, è necessario anche il legame con l'eparina o gli eparansolfato proteoglicani (HSPG) per la dimerizzazione del recettore e l'attivazione del complesso FGF-FGFR. (Ibrahimi et al., 2004) Il *signaling* di FGFR1 ha un ruolo importante in processi quali l'embriogenesi, l'omeostasi, la regolazione del citoscheletro, in alcuni tipi di tumore e nella guarigione delle ferite. Diversi studi sul *pattern* di espressione dei recettori e dei ligandi, appartenenti alla famiglia degli FGF, svolti durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale indicano il ruolo critico di FGF nella formazione iniziale dei tessuti neurali. (Gonzalez-Martinez et al., 2004) Questa attività è presente anche nel proencefalo rostrale, agendo direttamente sullo sviluppo dei bulbi olfattori, ciò potrebbe influenzare l'attività migratoria dei neuroni GnRH-secernenti. (Hebert et al., 2003) I topi *FGFR1*<sup>-/-</sup> - *knock-out* (KO) mostrano una proliferazione di cellule alla fine della zona anteriore del telencefalo, portando all'aplasia dei bulbi olfattori. Inoltre nei topi con dominante negativo *FGFR1*<sup>-/-</sup> trasfettato specificatamente nei neuroni GnRH, si ha una riduzione del 30% degli stessi neuroni ipotalamici GnRH-secernenti, (Tsai et al., 2005) insieme alla

comparsa precoce dei neuroni GnRH-secernenti che appare invece interrotta nei topi ipomorfici *FGFR1*<sup>-/-</sup>. (Chung et al., 2008) Pertanto, le mutazioni *loss-of-function* di *FGFR1* comportano un difetto nella migrazione dei neuroni GnRH-secernenti a causa di un non corretto sviluppo dei bulbi olfattori, mentre le mutazioni *gain-of-function* causano craniosinostosi. (Hu and Bouloux, 2010) Il gruppo di Dodè (Dode and Hardelin, 2004) per primo ha riportato l'associazione fra mutazioni *loss-of-function* di *FGFR1* con la forma dominante della sindrome di Kallmann. Da allora sono state identificate, diverse mutazioni di *FGFR1*, tutte nella isoforma *FGFR1IIIc*, presenti in tutti i domini funzionali del recettore. Queste mutazioni sono stati identificate sia in soggetti affetti KS, che in pazienti normosmici. (Pitteloud et al., 2006a; Trarbach et al., 2006) In maniera analoga a ciò che accade per le mutazioni a carico di *KAL1*, sono presenti altri difetti non riproduttivi e non-olfattivi associati alla sindrome di Kallmann dovuti a mutazioni di *FGFR1*, quali la palatoschisi e/o la labioschisi, agenesia dentale e sincinesie bimanuali. (Trarbach et al., 2007) Anche in questo caso si evidenzia una forte variabilità fenotipica dei pazienti con mutazioni di *FGFR1* sia in probandi isolati sia in pedigree familiari. Infatti si sono osservati sia casi di KS, che di iposmia isolata (senza ipogonadismo), che di ICH normosmico, in pazienti recanti la stessa mutazione all'interno di una famiglia. (Pitteloud et al., 2006b) La presenza di geni interattori, il coinvolgimento di più geni o un meccanismo di regolazione epigenetica, potrebbero essere la spiegazione di questa diversa espressione fenotipica relativa a questi difetti genetici. (Sykiotis et al., 2010) E' quindi evidente che una precisa regolazione del signaling di *FGFR1* sia essenziale per il normale sviluppo, mentre una downregolazione o un iperattivazione di questo pathway causano i diversi fenotipi patologici.

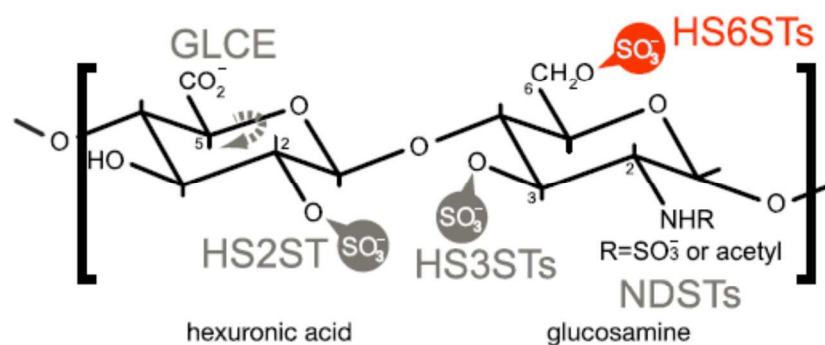
D'altra parte la famiglia degli FGF è composta da 22 proteine ligando strutturalmente correlate, ma con delle differenze a livello di sequenza primaria che determinano la specificità di interazione fra FGF ligandi ed FGF recettori, in maniera tale da regolare le diverse funzioni del *FGFR* pathway. (Falardeau et al., 2008)

Almeno 11 ligandi FGF possono attivare l'*FGFR1*, ma l'*FGF8* è stato identificato come ligando principale per l'*FGFR1IIIc* nella patogenesi del KS e del nICH. Infatti il gene *FGF8* (OMIM: 600483), situato sul cromosoma 10q24, è anche chiamato *KAL6*. Il suo ruolo nella malattia è stato confermato anche in topi KO omozigoti per l'allele *FGF8*, i quali presentano un fenotipo caratteristico con un telencefalo piccolo e l'agenesia dei bulbi olfattori. Inoltre sono presenti anche altri difetti nel distretto cardiaco, nell'area cranio-facciale, nel proencefalo, nel mesencefalo, nel cervelletto e anomalie dello sviluppo tra cui l'assenza di neuroni GnRH-secernenti. (Chung et al., 2008; Sykiotis et al., 2010) Nel complesso questi dati dimostrano il ruolo cruciale dell'*FGF8*

nell'attivazione del *signaling* attraverso la formazione del complesso FGF8/FGFR1/HS durante lo sviluppo dei neuroni GnRH-secernenti lo sviluppo del sistema neuronale e dei bulbi olfattori.

### HS6ST1

HS6ST1, è un gene (OMIM: 604846) situato sul cromosoma 2q21, coinvolto nei processi di glicosilazione extracellulare, è stato infatti trovato mutato nei pazienti ICH. (Tornberg et al., 2011) Gli eparansolfati (HS) sono dei componenti della matrice extracellulare, che modulano le interazioni cellula-cellula. Essi sono fondamentali per il processo di sviluppo neurale. (Inatani et al., 2003)

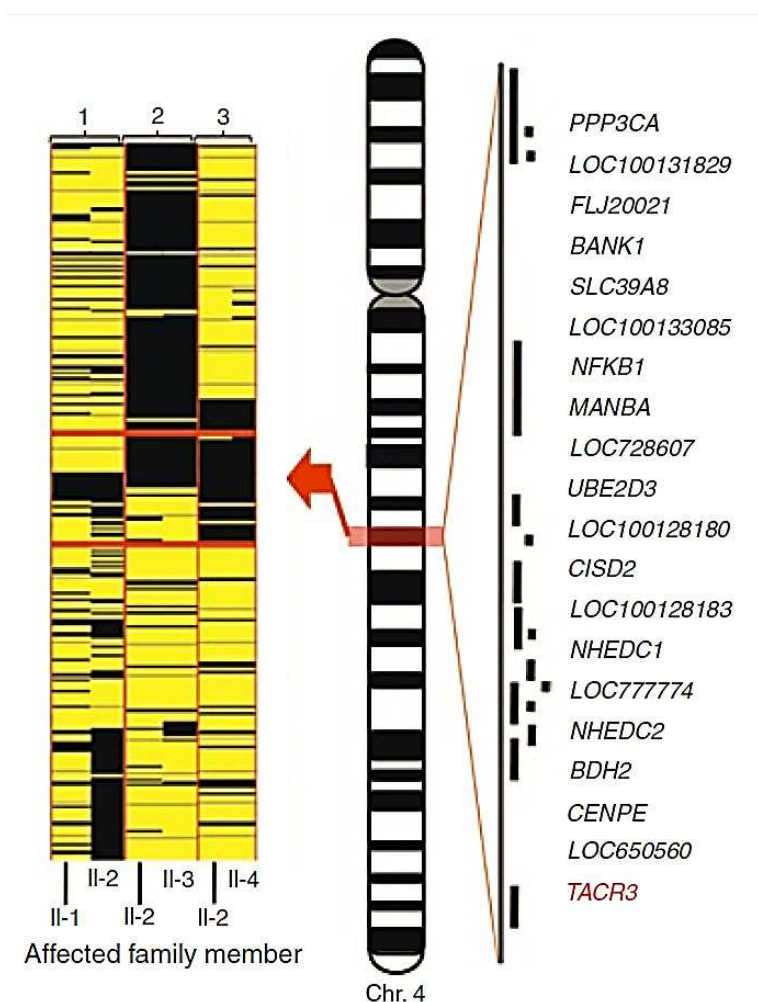


**Figura 7:** struttura chimica degli eparansolfati con evidenziato in rosso il residuo che viene solfatato da parte dell'enzima HS6ST1 Tornberg PNAS 2011 (Tornberg et al., 2011)

L'interazione con gli HSPG è importante per l'attivazione del complesso FGFR-FGF (Ibrahimi et al., 2004) e per l'interazione dell'anosmina-1 con la membrana cellulare. (Hu et al., 2004; Soussi-Yanicostas et al., 1996; Hudson et al., 2006) L'importanza di queste interazioni molecolari è stata confermata in un modello di nematodi transgenici (*C.elegans*) in cui è stato fatto sia il *knock down* che l'overespressione dell'ortologo di KAL1 nei neuroni: il fenotipo di ramificazione degli assoni viene revertito nei vermi mutanti privi sia HS6ST1 sia della C5-epimerasi, un altro enzima coinvolto nella biosintesi dei HSPG. [34 35] HS6ST1 appare mutato sia in pazienti con KS che con nICH, anche in questo caso si ha una forte eterogeneità fenotipica e nell'età di esordio della patologia. La variabilità clinica è evidente anche all'interno delle varie famiglie dei probandi in cui più parenti recano la stessa mutazione, pur esprimendo fenotipi differenti. Tutte le varianti di HS6ST1 identificate sono state testate sia *in vivo* e *in vitro*, ed in entrambi i saggi si è osservata una ridotta attività. (Tornberg et al., 2011)

## TAC3 e TAC3R

L'applicazione degli studi su casi familiari di nICH, nei rari casi di famiglie di consanguinei con più pazienti affetti e nessuna mutazione nei geni già noti come causativi per nICH, ha portato all'identificazione di 3 diverse mutazioni di tipo *loss-of-function* in TACR3 (OMIM: 152332), un gene localizzato sul cromosoma 4q25 che codifica per il recettore per la Neurokinina 3 (NK3R); e di una mutazione sul gene TAC3 (OMIM: 162330), localizzato nel cromosoma 12q13-q21 e che codifica per la Neurochinina B (NKB o TAC3) che il ligando endogeno di NK3R. (Topaloglu et al., 2009; Guran et al., 2009) La scoperta del *locus* del TACR3, è stata possibile grazie all'utilizzo di analisi di *linkage* per l'identificazione delle zone in perdita di eterozigotà in comune fra parenti affetti da ICH all'interno della stessa famiglia (vedi figura 8)



**Figura 8:** analisi di autozigosità al fine di individuare zone comuni di delezione/perdita di eterozigotà in familiari affetti da ICH. (Topaloglu et al., 2009)

Dopo questo studio si sono susseguiti degli studi su TAC3 e TACR3, che hanno portato all'identificazione di diverse mutazioni su questi due geni; ciò conferma

ulteriormente quanto il sistema NKB/NK3R sia fondamentale per la normale attivazione dell'asse HPG durante la pubertà. Inoltre, l'associazione con micropene e criptorchidismo nei pazienti maschi affetti da mutazioni a carico di TACR3, indica come un corretto *signaling* del sistema NKB/NK3R sia necessario per la secrezione fetale di gonadotropine (minipubertà). La neurochinina B è un membro della superfamiglia delle tachikinine, alla quale appartengono altri neuropeptidi quali la sostanza P e la Neurokinina A. NK3R è un GPCR principalmente espresso nel sistema nervoso centrale ed è il più selettivo dei recettori per le tachikinine; infatti questo recettore lega ed è attivato preferenzialmente dalla neurochinina B. (Maggi and Schwartz, 1997; Sandoval-Guzman and Rance, 2004)

Il meccanismo attraverso il quale le mutazioni nel pathway NKB agiscono sul sistema di controllo neuroendocrino della pubertà e della riproduzione è ancora sconosciuto. (Semple and Topaloglu, 2010b) La NKB è espressa nel nucleo arcuato dei neuroni ipotalamici che si proiettano verso i neuroni GnRH-secernenti; in questa zona è espressa anche la Kisspeptina, ed entrambi i peptidi nel nucleo arcuato sono down-regolati dagli estrogeni. Sulla base di questi dati sembra che la Kisspeptina ed NKB giochino un ruolo simile nel *feedback* di risposta degli ormoni steroidei alla produzione di GnRH.

Comunque altre osservazioni sembrano indicare importanti differenze nella loro azione, come ad esempio la differente abilità di stimolare la secrezione di GnRH in varie specie (la Kisspeptina può stimolare il rilascio di GnRH in quasi tutte le specie, al contrario di NKB che sembra essere più specie-specifico come ligando), o i differenti fenotipi che sono stati visti fra i modelli murini KO per la Kisspeptina o per la Neurochinina B. (Sandoval-Guzman and Rance, 2004) Nello specifico nel caso della Kisspeptina i topi presentano un fenotipo ICH-like, mentre nel caso di NKB sembrano essere topi con una normale fertilità.

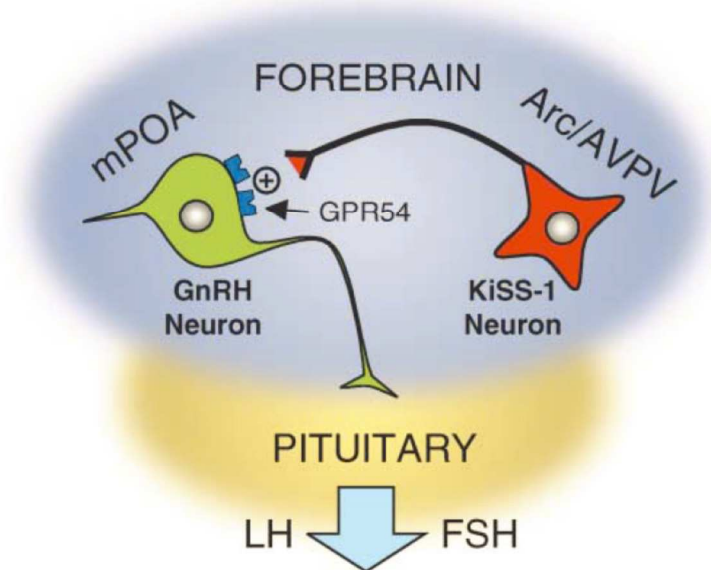
L'NKB ha un pattern più ampia espressione a livello del sistema nervoso centrale (SNC) rispetto alla Kisspeptina (Chawla et al., 1997), ciò suggerisce che il nucleo arcuato possa non essere la sola zona, o quantomeno non la più importante, in cui NKB svolge il suo ruolo nell'ambito del controllo neuroendocrino della riproduzione.

Inoltre le indagini sui pazienti affetti da mutazioni in questi geni a differenti stadi di sviluppo, dimostrano che le varianti nel *pathway* di NKB possono profondamente impattare sul funzionamento dell'asse neuroendocrino HPG durante le ultime fasi della gravidanza; comunque, l'effetto di queste stesse mutazioni sembra essere mitigato durante lo sviluppo da una parziale o completa reversione del fenotipo di ipogonadismo durante la vita adulta.

## KISS1 e KISS1R

Il gene umano GPR54 (alias KISS1R OMIM: 604161) è posizionato sul cromosoma 19p13.3 e codifica per un GPCR di 389 aminoacidi. Il legame col suo ligando KISS1 determina una trasduzione del segnale a valle tramite l'accoppiamento con proteina Gq che causa l'accumulo di IP3 e di calcio intracellulare. GPR54 ha, come detto, una specificità per i piccoli peptidi derivanti dal gene KISS1. (Kotani et al., 2001a)

Il gene KISS1 (OMIM: 603286) è localizzato sul cromosoma 1q32 e codifica per un peptide precursore di 145 aminoacidi, Kisspeptina-1, il quale una volta tagliato proteoliticamente produce quattro peptidi maturi: il più lungo è un peptide di 54 aminoacidi conosciuto come Kisspeptina-54 o metastatina (composto da 68-121 aminoacidi); mentre i tre prodotti più piccoli, formati rispettivamente da 14, 13 e 10 residui (Kiss-14, Kiss-13 e Kiss-10). Tutti i quattro peptidi hanno la stessa affinità e la stessa efficacia nei confronti del recettore KISS1R, ad indicare che è la parte C-terminale del peptide è quella responsabile del legame e dell'attivazione del recettore. (Kotani et al., 2001b) Comunque nonostante il fatto che tutti i quattro peptidi siano biologicamente attivi, la rilevanza *in vivo* dei peptidi più corti è ancora ignota. GPR54 è espresso sia nell'ipotalamo che nell'ipofisi, mentre KISS1 è espresso solo nell'ipotalamo. Studi farmacologici e fisiologici hanno dimostrato il coinvolgimento del complesso KISS1-GPR54 nell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG). I topi KO per KISS1R mostrano un fenotipo di ICH con una quasi assente maturazione sessuale anche in presenza di neuroni GnRH-secernenti che avevano correttamente raggiunto la loro sede ipotalamica e che hanno un normale contenuto di GnRH. Ciò dimostra che il KISS1R è implicato sia nel processamento che nella secrezione di questo ormone, ma non nella migrazione dei neuroni GnRH-secernenti. (Seminara et al., 2003; Messenger et al., 2005)



**Figura 9:** modello di azione fisiologica del sistema neuroni Kiss1-neuroni GnRH. I neuroni esprimanti KiSS-1, nel nucleo arcuato (ARC) e nel nucleo anteroventrale periventricolare (AVPV), fanno dei contatti sinaptici con i neuroni GnRH-secernenti all'interno dell'area preottica (POA). Dopo l'attivazione del recettore per la kisspeptina-1 (GPR54), i neuroni GnRH sono stimolati a rilasciare GnRH nella circolazione portale, che a sua volta stimola il rilascio di gonadotropine da parte dell'ipofisi. (Smith et al., 2006)

Diversi studi hanno dimostrato la capacità della kisspeptina di stimolare il rilascio di LH ed FSH in diverse specie animali (Messenger et al., 2005; Navarro et al., 2004) e nell'uomo. (Dhillon et al., 2005) Questo effetto è mediato dall'interazione KISS1-GPR54, in quanto non è presente nei topi KISS1R KO ed è dipendente dalla secrezione del GnRH; inoltre questo fenomeno non sembra essere dovuto ad un'azione diretta della kisspeptina sulle cellule dell'ipofisi perché esso viene inibito dalla co-somministrazione di un antagonista del GnRH. (Gottsch et al., 2004; Matsui et al., 2004; Navarro et al., 2005) In letteratura sono stati descritti anche alti modelli murini KO per KISS1R e KISS1 e tutti mostrano un fenotipo *ICH-like*, ciò conferma che il sistema recettore-ligando KISS1-KISS1R sia un forte modulatore della secrezione di GnRH. (Chan et al., 2009a) Di contro i neuroni Kiss1-secernenti sono anche altamente responsivi agli estrogeni e sono stati visti essere implicati sia nei processi di feedback centrali positivi e negativi degli steroidi sessuali sulla produzione di GnRH. (Rance, 2009; Clarkson et al., 2009; Clarkson and Herbison, 2009) Nel 2003, usando un metodo di analisi di *linkage* in casi di nICH, due differenti gruppi hanno identificato contemporaneamente la presenza di mutazioni *loss-of-function* nel gene KISS1R come causa genetica di questa patologia. (Seminara et al., 2003; de et al., 2003) Sono stati pubblicati di recente altri lavori che riportano mutazioni *loss-of-function* in modalità autosomica recessiva (AR) di nICH, nonostante

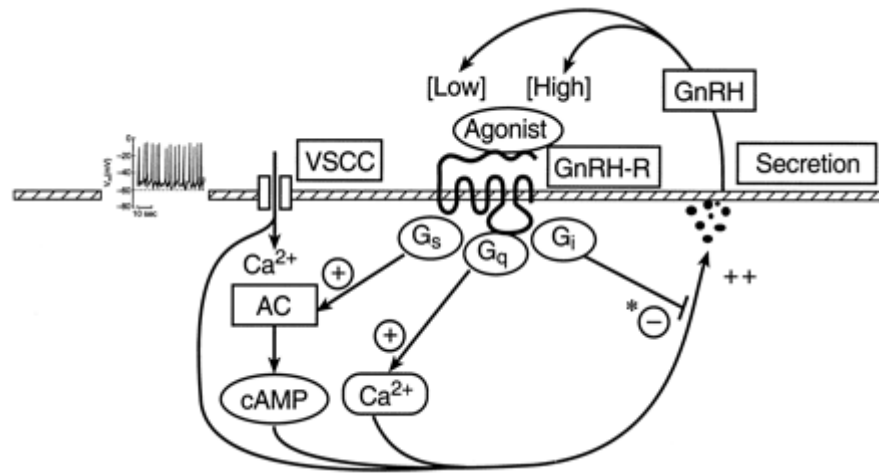
questa causa genetica di nICH resti comunque estremamente rara. (Semple and Topaloglu, 2010a) Considerando l'importanza biologica che svolge il complesso KISS1-KISS1R sul controllo dell'inizio dello sviluppo puberale, ne consegue che il gene KISS1 è un candidato obbligato per lo screening genetico in casi di ICH. Ad oggi però nessuna mutazione patogenetica di KISS1 è stata identificata in associazione ad ICH.

### GnRH e GnRHR

Nonostante il fatto che il gene autosomico codificante per il GnRH peptide (GNRH1, localizzato sul cromosoma 8p21-8p11.2; OMIM: 152760) fosse il candidato ovvio per il deficit isolato di GnRH, le prime mutazioni su questo gene sono state riportate solo nel 2009 da due lavori usciti quasi contemporaneamente. (Bouligand et al., 2009; Chan et al., 2009b) Il GnRH che attiva il GnRH recettore e di conseguenza il *pathway* a valle, è uno dei più importanti fattori dell'asse HPG, ciò lo rende il candidato ovvio per produrre un puro difetto funzionale nell'attività del GnRH. Questo, in associazione con un fenotipo di ipogonadismo (*hpg*) nei modelli murini sperimentali, nei quali l'ipogonadismo centrale (CH) è collegato a mutazioni autosomiche recessive del gene GnRH e in un'assenza completa della sintesi di GnRH. (Mason et al., 1986; Cattanach et al., 1977) I topi *Hpg* presentano un mancato sviluppo sessuale e di conseguenza infertilità. A livello biochimico essi sono caratterizzati da bassi livelli di ormoni sessuali steroidei e di gonadotropine. Per di più, oltre ai deficit nella riproduzione, questi topi presentano un fenotipo per la maggior parte normale, fatta eccezione per una anormale maturazione dentaria e biomineralizzazione. Inoltre, i deficit riproduttivi dei topi *Hpg* venivano completamente revertiti e l'espressione di GnRH veniva ripristinata dopo trattamenti di terapia genica. (Mason et al., 1986)

L'altra proteina coinvolta in questo sistema recettore-ligando è il GnRHR, un GPCR appartenente alla famiglia dei recettori codificato a partire dal gene GNRHR (OMIM: 138850), il quale localizza sul cromosoma 4q21.2. Mutazioni a carico di questo gene sono state identificate da circa 15 anni nei pazienti affetti da ICH. (de et al., 1997) L'attivazione del GnRHR causa un aumento dell'attività della fosfolipasi C e la mobilizzazione del  $Ca^{2+}$  tramite il *coupling* con le G-proteine  $G_q/G_{11}$ .





**Figura 10:** meccanismo proposto per la secrezione pulsatile di GnRH e per il pathway di trasduzione del segnale associata allo stesso recettore. Il rilascio neuronale di GnRH promuove l'afflusso di  $\text{Ca}^{2+}$  tramite i canali VSCC (*voltage-sensitive calcium channel*), con una conseguente stimolazione alla produzione di cAMP da parte dell'adenilato ciclasi (AC) ed infine questo attiva il signaling della proteina chinasi C- $\text{Ca}^{2+}$  dipendente. Tutto ciò causa l'aumento del rilascio di GnRH. La regolazione autocrina  $G_s$  a  $G_i$ , in presenza di alte concentrazioni di GnRH a livello locale. Ciò interrompe l'aumento della neurosecrezione ed è seguito da un ritorno ai livelli basali del sistema e da una successiva riattivazione della secrezione  $\text{Ca}^{2+}$ /cAMP dipendente interrompe l'aumento neurosecretion ed è seguita da una caduta al basale e successiva riattivazione della secrezione attraverso il risorgente  $\text{Ca}^{2+}$  segnalazione cAMP percorsi. (Krsmanovic et al., 2003)

I topi KO per il GNRHR mostrano un fenotipo clinico che comprende i sintomi caratteristici di ICH. Un fenotipo più severo si osserva invece nel caso dei topi GnRH KO ottenuti con *gene-trapping* (Wu et al., 2010), se paragonati con la N-etil-N-nitrosourea (Pask et al., 2005); questi modelli mostrano organi sessuali poco sviluppati in presenza di ridotti livelli di LH/FSH e di steroidi sessuali, una mancata maturazione sessuale, infertilità e l'incapacità di rispondere alla stimolazione col GnRH esogeno.

In seguito alle prime mutazioni riportate nell'uomo, ne sono state identificate e descritte numerose altre, fra le quali mutazioni nel dominio transmembrana del recettore. Queste mutazioni hanno un forte effetto sul funzionamento del sistema GnRH/GnRHR in quanto vanno ad impattare sul sito di *binding* per il ligando e/o sul *signalling*. (Trarbach et al., 2007) Questa variabilità a livello genetico, si riflette in una variabilità fenotipica ancora più accentuata che spazia da un quadro di "sindrome eunuco fertile", ad un ipogonadismo ipogonadotropo idiopatico parziale, fino ad una forma di resistenza al GnRH caratterizzata da criptorchidismo, micropene, gonadotropine non rilevabili e assenza di sviluppo puberale. (Silveira et al., 2002)

Nonostante ciò, sia difetti in GnRH1 che in GnRHR producono un classico nICH isolato senza nessun difetto dello sviluppo associati. (Semple and Topaloglu, 2010a)

### CHD7

La sindrome di CHARGE (*colobomata, heart anomalies, choanal atresia, retardation, genital and ear anomalies*), è una sindrome multi-sistemica autosomica dominante (AD), che condivide delle caratteristiche cliniche dell'ICH e l'iposmia del KS. Questa sindrome è causata da mutazioni a carico del gene CHD7 (*chromodomain helicase DNA-binding protein 7*; OMIM: 608892), il quale è localizzato sul cromosoma 8q12.1. Un lavoro di screening genetico su una coorte di pazienti ICH/KS ha evidenziato la presenza del 6% di CHD7 in questa casistica. Questo suggerisce che il KS/ICH sono varianti attenuate della sindrome di CHARGE e possono anche essi essere causati da mutazioni di CHD7 (Kim et al., 2008); che infatti viene identificato anche come KAL5. Ulteriori studi hanno dimostrato che le mutazioni in CHD7 possono essere presenti in pazienti KS che presentano anche delle caratteristiche fenotipiche della sindrome di CHARGE. (Jongmans et al., 2009) In considerazione di ciò lo screening per CHD7 può essere considerato nel caso di pazienti KS/ICH, che presentino caratteristiche peculiari quali sordità, orecchie dismorfiche e/o ipoplasia o aplasia dei canali semicirculari.

### NELF

La proteina Nelf (*nasal embryonic LH-releasing hormone factor*) è stata isolata per la prima volta in topo; il suo *pattern* di espressione è localizzato agli assoni olfattori e ai neuroni GnRH-secernenti durante lo sviluppo. Ciò è concorde con la sua funzione di fattore pro-migratorio per i neuroni GnRH-secernenti. (Kramer and Wray, 2001; Kramer and Wray, 2000) Comunque, nonostante il fatto che ad oggi siano state identificate solo raramente delle varianti di questo gene in pazienti KS (Sykietis et al., 2010; Miura et al., 2004; Pitteloud et al., 2007a; Xu et al., 2011), non è stato effettuato nessuno studio funzionale al riguardo.

### EBF2

Il gene codificante per Ebf2 gioca un ruolo chiave nell'asse neuroendocrino della riproduzione, come evidenziato dal gruppo di Corradi nel 2003. (Corradi et al., 2003) Nei topi mutanti KO per EBF2 infatti si ha una mancata formazione del corretto asse HPG, in conseguenza del fatto che si ha una mancata migrazione dei neuroni GnRH-secernenti. Ad oggi però nessuna mutazione è mai stata riportata in tale gene, nonostante il fatto che siano state screenate varie coorti di pazienti KS/nICH. (Trarbach et al., 2005)

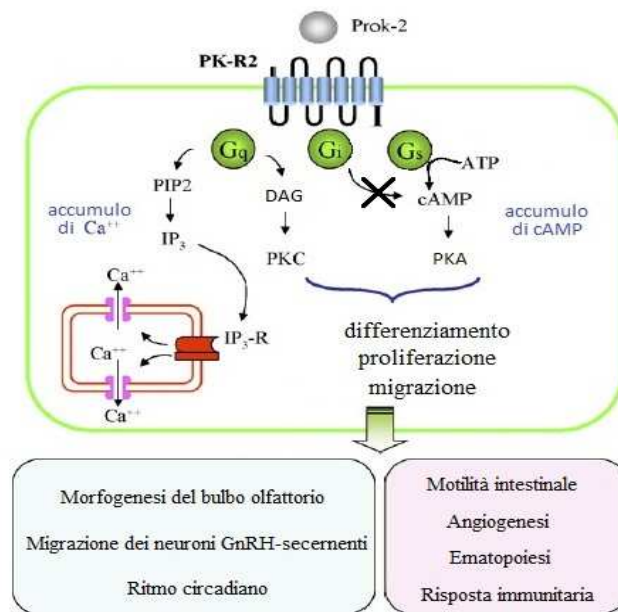
## PROKR2 e PROK2

Questi due geni, rispettivamente recettore (PROKR2 o KAL3, OMIM: 607123, situato sul cromosoma 20p13) e ligando coniugato (PROK2 o KAL4, OMIM: 607002, situato sul cromosoma 3p21.1), sono stati identificati come geni causativi per KS in quanto il modello murino *knock-out* ha evidenziato un mancato sviluppo dei bulbi olfattori, combinato con gravi difetti degli organi dell'apparato riproduttore (atrofia dei testicoli nei maschi e delle ovaie, dell'utero, della vagina e delle ghiandole mammarie nelle femmine; concentrazioni plasmatiche ridotte del testosterone e dell'ormone follicolo-stimolante (FSH); livelli ridotti dell'RNA messaggero del FSH e del LH a livello ipofisario; assenza del GnRH e dei neuroni GnRH-secernenti a livello ipotalamico). (Matsumoto et al., 2006)

Il sistema delle prokineticine è composto da 2 recettori, PROKR1 e PROKR2, con una elevata similarità di sequenza (85% di omologia) e dai loro due ligandi, PROK1 e PROK2, che invece hanno un'omologia di sequenza ridotta e mostrano un'espressione tissutale differente. Il gene PROKR2 non è espresso ubiquitariamente, ma si trova prevalentemente a livello degli organi riproduttivi e del sistema nervoso centrale. Nei testicoli è espresso a livello delle cellule endoteliali dell'interstizio, dove promuove l'angiogenesi (LeCouter et al., 2003). Nell'utero è trascritto dalle cellule endoteliali, stromali, muscolari lisce e dall'epitelio ghiandolare (Maldonado-Perez et al., 2007). Nel SNC è espresso nell'amigdala, nell'ippocampo, nell'ipotalamo, nella corteccia cerebrale e nel lobo frontale (Soga et al., 2002). L'alto livello d'espressione di PROKR2 trovato nel cervello fetale fa presupporre un ruolo fondamentale di questo recettore durante il suo sviluppo embrionale. Nel bulbo olfattorio, nella via migratoria rostrale (RMS) e nella zona subventricolare (SVZ) i trascritti di PROKR2 identificano i neuroblasti migranti verso il bulbo e i loro progenitori, chiamati cellule di tipo A e cellule di tipo C, rispettivamente (Puverel et al., 2009). Il recettore 2 delle prokineticine è espresso anche dalle cellule endocrine della corteccia surrenale, in particolare nelle zone glomerulosa e fascicolata (Keramidas et al., 2008). Per quanto riguarda le cellule emopoietiche, l'espressione di PROKR2 sembra essere ristretta a determinati tipi cellulari, quali i linfociti CD8+, i neutrofili, i monociti e le cellule staminali emopoietiche. Infine, nel tratto gastrointestinale, è stato identificato esclusivamente a livello dell'intestino cieco e dell'ileo (Lin et al., 2002).

PROKR2 è in grado di interagire con le proteine  $G_q$ ,  $G_i$  e  $G_s$ , causando la produzione di IP3 e la mobilitazione del calcio intracellulare (Soga et al., 2002), la fosforilazione della P44/p42 MAPK (Lin et al., 2002) e della serina/treonina chinasi Akt (Melchiorri

et al., 2001) e l'accumulo di cAMP (Chen et al., 2005), rispettivamente. L'attivazione di PROKR2 regola diversi processi cellulari, quali la proliferazione, il differenziamento, la migrazione e la mobilitazione cellulari. Il *signalling* delle prokineticine promuove la motilità dell'intestino nel tratto digerente (Kaser et al., 2003) e l'angiogenesi nelle ghiandole surrenali (Keramidas et al., 2008) e negli organi riproduttivi (Maldonado-Perez et al., 2007); modula la morfogenesi del bulbo olfattorio e la migrazione dei neuroni GnRH-secernenti (Matsumoto et al., 2006; Prosser et al., 2007a), il ritmo circadiano (Prosser et al., 2007b), l'ematopoiesi e la risposta immune (LeCouter et al., 2004)



**Figura 11:** il signalling di PROKR2 e le sue implicazioni fisiologiche.

Nel 2006 il gruppo di Dodè (Dode et al., 2006) ha dimostrato che le mutazioni a carico di questi geni possono causare ipogonadismo ipogonadotropo sia normosmico che associato ad anosmia. Da allora sono state descritte in letteratura 27 mutazioni a carico di PROKR2 ed 11 a carico di PROK2; la maggior parte delle quali sono mutazioni missenso, alcune delle quali sono presenti anche sulla popolazione apparentemente sane, a conferma della penetranza incompleta di queste mutazioni e dell'estrema variabilità fenotipica correlata con tali patologie. Successivamente l'effetto deleterio a livello molecolare ascrivibile a tali mutazioni è stato dimostrato in diversi esperimenti *in vitro*. (Cole et al., 2008a; Monnier et al., 2009). Tali studi si sono avvalsi di metodi di studio in vitro attraverso i quali hanno valutato l'espressione in membrana di costrutti plasmidici contenenti PROKR2 umano wild-type e mutato. Tuttavia tali studi di espressione si sono avvalsi di metodiche ELISA che pertanto hanno permesso di valutare solo in modo indiretto l'espressione in membrana dei

diversi mutanti, mediante la sottrazione del segnale ottenuto con cellule integre e con cellule permeabilizzate. D'altro canto sono stati condotti anche saggi funzionali che hanno però esplorato solo l'attivazione della proteina Gq e quindi l'attivazione del calcio intracellulare e l'attivazione della via delle MAP chinasi. Finora non sono mai stati condotti studi funzionali atti a valutare l'attivazione della via Gs e quindi la produzione di cAMP.

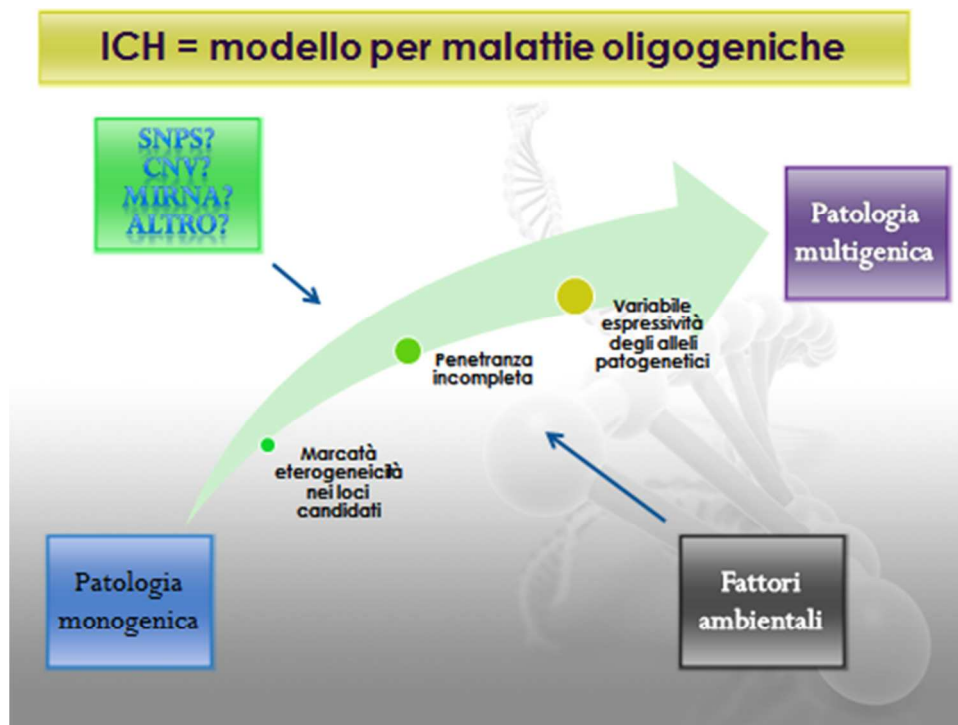
L'identificazione di diverse varianti presenti nei pazienti sia in eterozigosi che in omozigosi (o in eterozigosi composita) in pazienti non imparentati depone a favore di un possibile meccanismo di ereditarietà oligogenica per l'ICH nei pazienti con mutazioni in eterozigosi. (Dode et al., 2006; Cole et al., 2008a; Monnier et al., 2009) Inoltre sono stati identificati diversi sintomi associati alle mutazioni a carico di PROK2 e PROKR2, quali: displasia fibrosa, disordini del sonno, obesità grave, sincinesie ed epilessia. (Cole et al., 2008b)

## **MONOGENICITA', DIGENICITA' ED OLIGOGENICITA'**

Ad oggi in letteratura sono riportati sia differenti meccanismi di ereditarietà genetica delle varianti patogenetiche individuate nei 14 geni principali dell'ICH (autosomica dominante, autosomica recessiva, *X-linked*), sia differenti modalità di combinazione genica delle varianti identificate (monogenica, digenica, oligogenica). La causa genetica principale è data da variazioni monoalleliche di questi geni, anche se sempre più frequentemente dai dati di letteratura emerge come spesso alla base dei fenotipi patologici ci sia la presenza di due (digenicità) o più varianti patologiche (oligogenicità).

L'oligogenicità sembra essere quindi un tratto comune di questa patologia (come del resto in generale delle patologie rare); in quanto le varianti rare contribuiscono all'oligogenicità poiché possono essere trovate anche fra la popolazione sana, ma non sono sufficienti di per sé a dare il fenotipo patologico. Questo spiegherebbe anche il perché dell'estrema variabilità fenotipica all'interno di famiglie in cui più individui recano la stessa mutazione. A livello molecolare appare evidente che il deficit isolato di GnRH possa avere una componente oligogenica complessa, in quanto esso è il risultato di diversi eventi patofisiologici (ontogenesi dei neuroni GnRH, migrazione e signaling degli stessi). [vedi figura 4] Un dato interessante, analizzando anche una popolazione di controllo è che i casi di digenicità ed oligogenicità sono presenti in maniera esclusiva nei pazienti affetti da ICH. Queste osservazioni sono state effettuate su una coorte di 397 pazienti affetti da ICH (analizzando i geni FGFR1, KAL1, FGF8, PROKR2, GNRHR, KISS1R, NELF e PROK2), hanno consentito di fare

una stima dell'oligogenicità in questa patologia, che si attesta fra l'1,2 e il 4,6% del totale dei casi. (Pitteloud et al., 2010; Sykiotis et al., 2010)



**Figura 12:** l'ICH presenta i tratti caratteristici di una patologia multigenica e multifattoriale, infatti ciò si riflette sulla estrema variabilità fenotipica dei pazienti ICH, sulla diversa età di insorgenza e sulla penetranza incompleta delle mutazioni a carico di geni ICH. Ad oggi ciò non ha consentito di identificare una precisa correlazione genotipo-fenotipo per questa patologia.

*Scopo*

Nel presente lavoro di tesi, partendo dalla disponibilità della più ampia casistica nazionale di pazienti affetti da ICH, abbiamo deciso di:

- eseguire lo screening genetico dei principali geni candidati incluso il gene PROKR2.
- valutare dal punto di vista funzionale le varianti genetiche identificate nel gene PROKR2 mediante studi in vitro che ci hanno permesso di valutare sia le modificazione dell'espressione in membrana dei costrutti plasmidici recanti le varianti genetiche individuate, sia la loro capacità di attivare la via dei secondi messaggeri mediata dalla proteina  $G_q$  e, per la prima volta, anche della proteina  $G_s$ .
- cercare nuovi geni candidati che permettano di spiegare i 2/3 dei casi di ICH ancora senza causa genetica mediante un approccio *genome-wide* di caratterizzazione degli SNPs e dei CNVs di casi familiari di ICH opportunamente scelti.



# *Materiali e Metodi*

## CASISTICA

La casistica oggetto del nostro studio è stata raccolta nell'ambito del Gruppo di Studio SIE per gli ipogoandismi centrali idiopatici ed è costituita da un totale di 217 pazienti, di cui 134 maschi e 33 femmine (4M:1F). Tali pazienti sono così suddivisi tra KS e nIHH:

Fenotipo	Numero di pazienti (% del totale)	Rapporto M:F
<b>SK</b>	88 (41%)	3,5:1
<b>nIHH</b>	129 (59%)	4:1

**Tabella 2:** caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nella coorte in studio

Per la nostra analisi su chip Illumina abbiamo selezionato 8 casi con anamnesi positiva per familiarità e altrettanti controlli provenienti da parenti non affetti. Di questi casi 3 presentavano anosmia e 5 erano normosmici; il totale delle famiglie analizzate è di 5. Per quanto riguarda la parte dei controlli invece, abbiamo utilizzato 84 casi fra la popolazione apparentemente sana relativamente all'analisi degli SNPs e 1864 controlli fra la popolazione apparentemente sana per l'analisi dei CNV.

## ESTRAZIONE DEL DNA

Il DNA di ogni paziente è stato estratto da 3 ml di sangue periferico conservato in EDTA, utilizzando il kit di estrazione "Puregene DNA Purification Kit" (GENTRA Systems). Il protocollo di estrazione è il seguente:

- trasferire il sangue in una Falcon da 15 ml
- aggiungere 9 ml di Cell Lysis Solution e agitare
- lasciare in incubazione per 10', agitando ogni tanto
- centrifugare a 3.200 rpm per 10'
- eliminare il surnatante e vortexare vigorosamente il pellet
- aggiungere 3 ml di Nuclei Lysis Buffer e vortexare nuovamente
- aggiungere 1 ml di Protein Precipitation Solution e vortexare
- centrifugare a 3.200 rpm per 10'
- versare il surnatante in una nuova Falcon contenente 3 ml di isopropanolo e miscelare invertendo; si vede la formazione di un flocculo di DNA
- recuperare il flocculo con un uncino sterile e asciugarlo all'aria

- risospendere il flocculo asciutto in 250  $\mu\text{l}$  di buffer TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM) in una nuova eppendorf

Il DNA ottenuto viene quindi incubato una notte a temperatura ambiente in modo da reidratarsi completamente, viene quindi quantizzato allo spettrofotometro ed infine diluito ad una concentrazione finale di 100 ng/ $\mu\text{l}$ .

### PCR (Polimerase Chain Reaction)

Per ogni frammento genico, la mix di reazione viene preparata secondo il seguente protocollo:

DNA templatato	100 ng
Buffer 5X	5.0 $\mu\text{l}$
Primer Forward (10 pmoli/ $\mu\text{l}$ )	1.25 $\mu\text{l}$
Primer Reverse (10 pmoli/ $\mu\text{l}$ )	1.25 $\mu\text{l}$
dNTPs mix (10Mm ognuno)	0.5 $\mu\text{l}$
Go Taq Promega™ (5U/ $\mu\text{l}$ )	0.25 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O bidistillata sterile	↑ volume totale 25 $\mu\text{l}$

Il frammento viene amplificato in un termociclatore secondo il seguente protocollo:

Denaturazione iniziale	95° C	5'	} x 35 cicli
Denaturazione	95° C	30"	
Annealing	59° C	30"	
Estensione	72° C	50"	
Estensione finale	72° C	7'	

La sequenza codificante del gene PROKR2, comprese le regioni di giunzione introne-esone, è stata suddivisa in 2 frammenti per l'analisi degli esoni e amplificata usando gli oligonucleotidi senso (*Forward*) e antisenso (*Reverse*) descritti in tabella 3.

Esone	Primer Forward	Primer Reverse	Lunghezza frammento
1	GGCTCACTGACCCTGAAAGA	TGTCAGCCTGTCAGAGCCTA	619 bp
2	CGATTCACTGTGCCACTGC	CCATGCAGCCTATGAACTTG	880 bp

**Tabella 3:** primers utilizzati per l'amplificazione del gene PROKR2

## ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO

Il prodotto di ogni reazione di amplificazione viene controllato su un gel d'agarosio ad una percentuale adeguata alla dimensione dei frammenti d'interesse; nel nostro caso sono sempre stati utilizzati gel al 3% che separano adeguatamente bande dalle dimensioni comprese tra 100 e 1000 paia di basi (bp). Il gel viene preparato in un adeguato volume di buffer TAE 1X (0.04M Tris-acetato, 0.002M EDTA) e addizionato con bromuro d'etidio concentrato 10g/1. L'elettroforesi del campione (5µl) caricato su gel viene eseguita applicando una differenza di potenziale di 130mV; dopo circa 30' si visualizza il gel al transilluminatore e si verifica che sia presente l'amplificato del frammento d'interesse confrontandone le dimensioni con il marker di peso molecolare 100 bp DNA Ladder (Euroclone). Il restante campione può essere quindi purificato e sottoposto a sequenziamento.

## PURIFICAZIONE DEL FRAMMENTO AMPLIFICATO

Questo passaggio viene effettuato utilizzando un prodotto specifico commercializzato da Amersham Biosciences, GFX™ PCR – DNA and Gel Band Purification Kit: in questa fase vengono rimossi i sali, gli enzimi, i nucleotidi non utilizzati e gli oligonucleotidi presenti nella reazione che interferirebbero poi con il sequenziamento.

Il protocollo di purificazione è il seguente:

- aggiungere 500 µl di Capture Buffer in una colonnina
- trasferire 20 µl della reazione di PCR nella colonnina
- inserire la colonnina nel tubo apposito
- centrifugare per 1' a velocità massima
- buttare l'eluato
- aggiungere 500 µl di Wash Buffer
- centrifugare per 1' a velocità massima
- trasferire la colonnina in una nuova eppendorf da 1.5 ml
- depositare sul fondo della colonnina 25 µl di H<sub>2</sub>O sterile, facendo attenzione a non toccare il filtro

- centrifugare nuovamente per 1' a velocità massima per recuperare il DNA eluito

## REAZIONE DI SEQUENZA

Il sequenziamento automatico con il metodo dei terminatori di catena è simile alla PCR e si basa sulla sintesi di nuovi frammenti di DNA a singolo filamento e sull'incorporazione, oltre ai deossinucleotidi standard utilizzati per le reazioni di amplificazione, di dideossinucleotidi che terminano la sintesi della catena. Per la reazione sono necessari il frammento da sequenziare (precedentemente purificato), un solo oligonucleotide specifico, senso o antisenso, da cui partirà il sequenziamento e una mix "Big Dye Terminator" versione 3.1, fornita dalla Perkin Elmer, contenente deossinucleotidi trifosfati (dNTPs), Amplitaq DNA Polimerasi, magnesio, tampone e terminatori, cioè dideossinucleotidi legati ad un fluorocromo (ddNTPs\*) che varia in funzione del tipo di nucleotide e verrà quindi visualizzato con un colore differente (A: "HEK" verde, C: "FAM" blu, G: "NED" nero e T: "ROX" rosso).

La AmpliTaq DNA Polimerasi utilizzata è caratterizzata da due mutazioni: una nel sito attivo, che le permette di incorporare anche i dideossinucleotidi (terminatori), e una nel dominio N-terminale che elimina l'attività 3'-5' esonucleasica.

I particolari del protocollo sono i seguenti:

DNA	7 µl
Buffer 5X	4 µl
Primer Forward o Reverse (10 pmoli/µl)	1 µl
Big Dye Terminator v3.1	2 µl
H <sub>2</sub> O bidistillata sterile	↑ volume totale 20 µl

La reazione consiste di 25 cicli:

Denaturazione	95° C	30"
Annealing	50° C	15"
Estensione	60° C	2'

Le reazioni di sequenza dei frammenti genici sono state eseguite, per ciascuno di questi, con il primer senso e con quello antisenso, in modo da risolverne l'intera lunghezza.

Il prodotto della reazione di sequenza deve quindi essere purificato dall'eccesso di dideossinucleotidi e di sali e poi può essere analizzato dal sequenziatore automatico. La purificazione viene effettuata con specifiche colonnine "CENTRI-SEP Spin Column" commercializzate dalla Princeton Separations; il protocollo prevede i seguenti passaggi:

- idratare le colonnine con 700 µl di H<sub>2</sub>O sterile circa 30' prima dell'utilizzo
- posizionare le colonnine nell'apposito tubo
- centrifugare per 7' a 3.000 rpm per permettere la ricostituzione della resina
- trasferire la colonnina in una provetta da 1.5 ml
- applicare la reazione di sequenza al centro della resina
- centrifugare nuovamente a 3.000 rpm per 7'

Successivamente si trasferisce parte dell'eluato in una piastra MicroAmp® (Applied Biosystem) e vi si aggiungono 10 µl di formammide che favorisce la denaturazione del templat. A questo punto, dopo una breve denaturazione a 95°C (1' circa), la sequenza è pronta per essere caricata nel sequenziatore.

## SEQUENZIATORE E ANALISI DELLE SEQUENZE

La reazione di sequenza produce frammenti di diversa lunghezza della regione da sequenziare a causa della presenza dei terminatori: quando la polimerasi incorpora un dideossinucleotide, legato al fluorocromo specifico per una delle quattro basi nucleotidiche, non è più in grado di continuare la reazione di polimerizzazione ed il prodotto risulta troncato. Il principio di funzionamento del sequenziatore si basa sull'elettroforesi capillare, grazie alla quale i frammenti di minori dimensioni vengono assorbiti sulla colonna cromatografica più velocemente rispetto ai frammenti di dimensioni maggiori e vengono eccitati per primi dal laser che li irradia attraverso una finestra definita. A seconda della base con cui termina il frammento e, di conseguenza, del fluorocromo associato, il sequenziatore rileva un segnale di fluorescenza diverso.

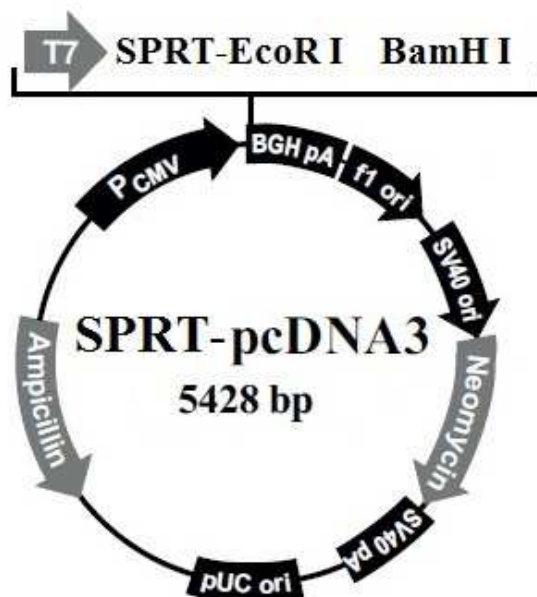
L'analisi dei segnali rilevati viene eseguita dal programma ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystem, Foster City, USA) e l'analisi di sequenza è eseguita con il programma Sequencing Analysis Navigator (Perkin Elmer Applied

Biosystem, Foster City, USA): la risultante è un profilo a picchi di diversa altezza e colore che identificano le quattro basi del DNA (elettroferogramma).

Nel caso in cui si confermasse la presenza dell'anomalia nella sequenza, l'intero procedimento viene ripetuto partendo da una nuova estrazione di DNA. In caso di ulteriore conferma, ci si deve assicurare che non si tratti di un polimorfismo (SNPs), verificando che l'alterazione non sia presente nel SNPs Database (Genebank) e che non si trovi in una popolazione controllo di soggetti sani con una frequenza superiore a 1%. Se la sostituzione aminoacidica risulta assente nel Genebank e presente con una frequenza inferiore a 1% nei controlli sani, si può escludere che si tratti di un SNP e pensare che possa avere un ruolo causale nella patogenesi della malattia in studio. Ciò può essere confermato dall'esecuzione di opportuni studi funzionali che mostrino tale nesso causale.

## SUBCLONAGGIO

In prospettiva degli studi funzionali, il cDNA del gene PROKR2 è stato inserito tramite subclonaggio in un vettore di espressione SPRT-pcDNA3 (vedi figura 13), già in uso nel nostro laboratorio. Il cDNA del gene PROKR2 è stato fornito dalla UMR (University of Missouri-Rolla) cDNA Resource Center (Rolla, MO, USA), inserito all'interno di un vettore pcDNA3.1+. Il cDNA è stato trasferito in un nuovo vettore di convenienza già in uso nel nostro laboratorio, SPRT-pcDNA3. Questo vettore contiene al 5' del sito di inserzione una sequenza denominata SPRT, che viene tradotta in frame alla proteina subclonata, legata al suo al N-terminale. Essa è costituita da un *signal peptide* (SP), che indirizza la proteina espressa alla membrana citoplasmatica, e da una *rhodopsin tag* (RT), un peptide di 20 aminoacidi rappresentanti il C-terminale della rodopsina bovina. Il vantaggio di usare questo vettore deriva dal fatto di possedere degli anticorpi monoclonali capaci di riconoscere il frammento RT in esperimenti di citofluorimetria e di valutare in modo diretto l'espressione in membrana di PROKR2.



**Figura 13:** rappresentazione del vettore SPRT-pcDNA3

### PCR DI MUTAGENESI

Per poter effettuare il subclonaggio, è stato necessario inserire al 5' del cDNA di PROKR2 un sito di restrizione per EcoRI e al 3' un sito per BamHI, in quanto il plasmide SPRT-pcDNA3 contiene questi siti utili per il subclonaggio e la sequenza SPRT è seguita *in frame* dal sito EcoRI. La mutagenesi è stata effettuata utilizzando la AccuPrime™ Taq DNA Polimerasi High Fidelity (Invitrogen), che garantisce un'amplificazione con un grado di fedeltà nove volte superiore alle altre polimerasi standard. I primers sono stati disegnati in modo da contenere al 5' sei nucleotidi addizionali rappresentanti i siti di restrizione per gli enzimi specifici e quattro nucleotidi con la funzione di stabilizzare l'oligonucleotide e proteggere il sito di taglio (Tabella 5).

Il protocollo della PCR di mutagenesi è il seguente:

DNA plasmidico	100 ng
Buffer 1, 10X	5.0 µl
Primer Forward (10 pmoli/µl)	1.0 µl
Primer Reverse (10 pmoli/µl)	1.0 µl
High Fidelity Taq (5U/µl)	0.5 µl
H <sub>2</sub> O bidistillata sterile	↑ volume totale 50 µl



Denaturazione iniziale	95° C	2'	} x 25 cicli
Denaturazione	95° C	30''	
Annealing	56° C	30''	
Estensione	68° C	3'	
Estensione finale	68° C	5'	

<b>Primer Forward - EcoRI</b>	ATCAGGATCCTCACTTCAGCCTGATACAGTCC
<b>Primer Reverse - BamHI</b>	ATCAGAATTCATGGCAGCCCAGAATGGAAAC

**Tabella 4:** primer utilizzati per l'inserimento dei nuovi siti di restrizione: in verde i 4 nucleotidi inseriti a protezione del sito di taglio; in rosso i sei nucleotidi del sito di taglio specifico

Per controllare l'avvenuta amplificazione, i prodotti della reazione di mutagenesi sono stati sottoposti per 30' a corsa elettroforetica su gel di agarosio 1%, applicando una differenza di potenziale costante di 130 Volt. I campioni (5µl) sono stati miscelati con Gel Loading Buffer 6X (1µl)(0,25% blu di bromofenolo; 0,25% xilene cianolo FF; 10% glicerolo). Il gel è stato poi controllato al transilluminatore con luce UV e la banda d'interesse è stata identificata tramite confronto con il marker di peso molecolare 1kb DNA Ladder (Invitrogen) analizzato contemporaneamente.

## DIGESTIONE ENZIMATICA PER SUBCLONAGGIO

Dopo la verifica su gel, i prodotti della PCR e il plasmide SPRT-PROKR2-pcDNA3 wt sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione specifici EcoRI e BamHI, in modo da creare delle estremità protrudenti per la successiva ligazione. Il protocollo prevede una digestione di 2 ore a 37° C e i seguenti reagenti:

DNA amplificato/plasmidico	7.0 µl
NEB 3 Buffer 10X	2.0 µl
BSA 10X	2.0 µl
EcoR I (10U/µl)	0.5 µl
BamH I (10U/µl)	0.5 µl
H <sub>2</sub> O bidistillata sterile	↑ volume totale 20 µl

## PURIFICAZIONE DA GEL D'AGAROSIO

Per controllare l'avvenuta digestione, i prodotti della reazione sono stati sottoposti per 30' a corsa elettroforetica su gel di agarosio 1%, a una differenza di potenziale costante di 130 Volt. Successivamente le bande contenenti il DNA di interesse sono state purificate dal gel utilizzando un prodotto specifico commercializzato da QIAGEN, QIAquick Gel Extraction Kit che permette di estrarre DNA delle dimensioni da 70bp a 10kb, secondo il seguente protocollo:

- tagliare la banda di interesse dal gel utilizzando un bisturi sterile e pesarla
- aggiungere il Buffer QG (contenente acetato e guanidina tiocianato) in quantità pari a 300 µl di tampone ogni 100 mg di banda
- incubare a 50° C per 10 minuti e in agitazione fino a quando l'agarosio si è completamente sciolto
- aggiungere 100 µl di isopropanolo ogni 100 mg di banda
- trasferire il campione nelle microcolonne QIAquick (contenenti una membrana di silice) e centrifugare per 1' a 13.000 rpm
- lavare la colonna con 750 µl di Buffer PE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 80% EtOH)
- eluire il DNA in 20 µl di H<sub>2</sub>O bidistillata sterile

## LIGAZIONE

La T4 DNA ligasi congiunge le estremità di molecole di DNA tagliate con enzimi di restrizione, catalizzando la formazione di un legame fosfodiesterico tra il gruppo fosfato in 5' di un nucleotide ed il gruppo idrossilico in 3' di un altro nucleotide.

Tutte le ligazioni sono state effettuate con 1 U di enzima (Gibco) considerando un rapporto molare 1:3 tra vettore e inserto, in opportune condizioni di concentrazione salina (50mM Tris-HCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM DTT; 1mM ATP; 25 µg/ml BSA), in un volume finale di 20 µl. Le reazioni sono state condotte a 14°C *overnight*.

Vettore	1 µl
Inserto	3 µl
Buffer 5X	4 µl
T4 ligasi (1U/µl)	1 µl
H2O bidistillata sterile	↑ volume finale 20 µl

## PRECIPITAZIONE DEL DNA

Al fine di ottenere il DNA più concentrato e privo di sali, onde evitare l'inibizione di reazioni successive, esso è stato precipitato con sodio acetato ed etanolo 100%, secondo il seguente protocollo:

- aggiungere ai 20 µl di digestione 5 µl di sodio acetato 3M pH=5,2, 30 µl di TE e 100 µl di etanolo 100% freddo
- incubare a -20° C per almeno 30'
- centrifugare a 13.000 rpm per 30' a 4° C per pellettare il DNA
- scartare il sovrantante per decantazione
- lavare il pellet per due volte con 500 µl di etanolo 70% freddo
- lasciar asciugare all'aria
- idratare con 10 µl di H<sub>2</sub>O bidistillata sterile

## TRASFORMAZIONE DELLE CELLULE BATTERICHE

Il protocollo di trasformazione prevede la preparazione delle cellule elettrocompetenti e la loro successiva trasformazione.

### PREPARAZIONE DEI BATTERI ELETTROCOMPETENTI

Una colonia batterica del ceppo DH5 $\alpha$ F' di E.coli è stata fatta crescere fino a O.D.<sub>600nm</sub>=0.5-0.7 in terreno 2x YT (in 1l: 16 mg di SELECT Peptone 140, 10 mg di SELECT Yeast Extract e 5 mg di NaCl - Invitrogen) + Kanamicina (50 $\mu$ g/l). Le colture batteriche sono state quindi centrifugate (4.000xg per 20 minuti a 4°C) per eliminare il terreno di crescita e il pellet è stato mantenuto in ghiaccio e risospeso in volumi successivi decrescenti di Hepes 1mM pH=7 freddo. All'ultimo passaggio i batteri sono stati risospesi in 10% glicerolo freddo, congelati su ghiaccio secco ed etanolo e conservati a -80°C.

### TRASFORMAZIONE PER ELETTROPORAZIONE

Le cellule elettrocompetenti sono state trasformate utilizzando l'elettroporatore GenePulser Xcell<sup>™</sup>, fornito dalla Biorad, secondo il seguente protocollo:

- in una cuvetta per l'elettroporatore raffreddata in ghiaccio aggiungere 4 µl del prodotto della reazione di mutagenesi (precipitato e idratato) e un'aliquota di 50 µl di batteri elettrocompetenti, conservati a -80° C fino al momento della trasformazione
- settare l'elettroporatore ai seguenti valori: 1,8 Kvolt; 25 $\mu$ F; 200 $\Omega$  e dare l'impulso

- aggiungere velocemente 900 µl di medium S.O.C. (in 100 ml: 2 g di Bacto® Tryptone, 0.5 g di Bacto® Yeast Extract, 1 ml di NaCl 1M, 0.25 ml di KCl 1M, 1 ml di glucosio 2M e 1 ml di stock  $Mg^{2+}$  2mM - 1M  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  + 1M  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – Invitrogen)
- incubare i batteri a 37° C per 45' in agitazione (170 rpm)
- piastrare 1/9 delle cellule e la restante parte su piastre di terreno solido LB-Agar (in 1l: 10 g di Bacto® Tryptone, 5 g di Bacto® Yeast Extract, 5 g di NaCl) addizionato di Ampicillina 50mg/ml
- lasciar crescere per una notte a 37°C

### SCREENING DEI CLONI LIGATI

I cloni positivi che hanno incorporato il plasmide e, con esso, la resistenza all'ampicillina, sono stati screenati mediante:

- PCR, per controllare l'avvenuta ligazione dell'inserito nel vettore
- sequenziamento automatico del DNA purificato, per controllare che durante la mutagenesi non siano state inserite mutazioni non volute.

### PCR SUL MEDIUM DI CULTURA BATTERICA

Sono state selezionate in media 6 colonie dalle piastre di LB-Agar con Ampicillina e sono state fatte crescere in 500 µl di LB con Ampicillina 50mg/ml per 5 ore a 37°C e circa 170 rpm. Successivamente è stata eseguita una PCR secondo lo schema già descritto nella sezione "Amplificazione genica", utilizzando i primer T7 e 741R, riportati in tabella 5.

### MINIPREP

Per la purificazione di ridotte quantità di DNA plasmidico (5-20 µg) è stato utilizzato il kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) secondo il protocollo fornito dal rivenditore:

- far crescere una singola colonia selezionata per la resistenza all'ampicillina e positiva allo screening per PCR *overnight* a 37°C in 5 ml di LB con Ampicillina 50mg/ml e in agitazione (170 rpm)
- pellettare i batteri centrifugando a 3.500 rpm per 5'
- scartare il surnatante
- risospendere il pellet in 250 µl di P1 Buffer (50mM Tris/HCl pH=8.0, 10mM EDTA, 100 µg/ml RnaseA)
- aggiungere 250µl di P2 Buffer (200mM NaOH, 1% SDS) e invertire la provetta 5-6 volte

- aggiungere 300 µl di N3 Buffer (Potassio acetato 5M, Acido acetico glaciale) e invertire nuovamente 5-6 volte
- centrifugare a 13.000 rpm per 10' per precipitare il lisato
- recuperare il surnatante ed applicarlo ad una QIAprep spin column contenente la membrana di silice alla quale si lega il DNA
- centrifugare a 13.000 rpm per 1'
- lavare il DNA con 750 µl di PE Buffer
- eluire il DNA con 40 µl di H<sub>2</sub>O bidistillata sterile

Il giorno seguente è stata stimata la concentrazione del DNA plasmidico ottenuto mediante lettura allo spettrofotometro ( $\lambda_1 = 260 \text{ nm}$ ).

### SCREENING PER SEQUENZIAMENTO

Il DNA purificato mediante Mini-PREP è stato sottoposto a sequenziamento automatico per controllare che la reazione di amplificazione non avesse inserito nel cDNA di PROKR2 mutazioni indesiderate. La reazione di sequenza è stata eseguita secondo il protocollo descritto nella sezione "Sequenziamento automatico", mentre i primers utilizzati nelle diverse reazioni di screening sono i seguenti:

<b>Primer T7</b>	TAATACGACTCACTATAGGG
<b>247Fw</b>	AAGTTGCGCAACCTCACC
<b>495Fw</b>	AATTATCAAACGGCCTCC
<b>724Fw</b>	TGCTATGCCAGGATCTCC
<b>741Rev</b>	GGAGATCCTGGCATAGCA
<b>930Fw</b>	TACCTCACTGCCTTCTACGTGG
<b>1130Rev</b>	TTCAGCCTGATACAGTCC

**Tabella 5:** primer utilizzati per lo screening del subclonaggio di PROKR2

### MAXIPREP

Per ottenere cospicue quantità di DNA plasmidico puro (nell'ordine delle centinaia di µg) del clone definitivo, si ricorre all'estrazione di DNA su larga scala, utilizzando il PureYield™ Plasmid Maxiprep System (Promega), secondo il protocollo indicato dal rivenditore:

- far crescere il clone selezionato tramite lo screening *overnight* a 37° C in 100 ml di TB (in 1l: 11.8 g di SELECT peptone 140, 23.6 g di Yeast Extract, 9.4 g di

dipotassium hydrogen phosphate e 2.2 g di potassium dihydrogen phosphate - Invitrogen) con Ampicillina 50mg/ml in agitazione a 200 rpm

- pellettare i batteri centrifugando a 5.000xg per 10'
- scartare il surnatante
- risospendere il pellet in 12 ml di Cell Resuspension Solution
- aggiungere 12 ml di Cell Lysis Solution, mischiare invertendo la provetta 3-5 volte e incubare 3' a temperatura ambiente
- aggiungere 12 ml di Neutralization Solution e invertire la provetta 10-15 volte
- centrifugare il lisato a 14.000xg per 20'
- montare le colonne PureYield™ Maxi Binding Column e PureYield™ Clearing Column sul vacuum manifold
- versare il surnatante nella Clearing Column e applicare il vuoto fino a quando tutto il lisato ha attraversato entrambe le colonne
- smontare la Clearing Column ed aggiungere 5 ml di Endotoxin Removal Wash nella Binding Column
- applicare il vuoto fino a quando la soluzione non ha attraversato la colonna
- aggiungere 20 ml di Column Wash e applicare nuovamente il vuoto
- asciugare il filtro della colonna applicando il vuoto per altri 5'
- smontare la Binding Column
- montare l'Eluator™ Vacuum Elution Device sul vacuum manifold e inserire la Binding Column sopra il Device
- aggiungere 1 ml di buffer TE ed incubare per 1'
- applicare il vuoto per eluire il DNA plasmidico

Il DNA plasmidico ottenuto viene quindi incubato una notte a temperatura ambiente in modo che si idrati completamente e successivamente quantizzato allo spettrofotometro.

### CREAZIONE DEI PLASMIDI MUTANTI

In prospettiva degli studi funzionali, le varianti del gene del PROKR2, identificate attraverso l'analisi genetica della nostra casistica, sono state inserite per mutagenesi in nel plasmide SPRT-PROKR2-pcDNA3.

Successivamente i costrutti sono stati amplificati in batteri e introdotti in cellule di mammifero (HEK 293 e CHO) per consentire l'espressione del recettore mutante e la valutazione degli effetti delle mutazioni.

## MUTAGENESI SITO SPECIFICA

### PCR DI MUTAGENESI

I costrutti mutanti sono stati prodotti mediante un protocollo Stratagene (QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit), utilizzando la *Pfu Turbo*® DNA polimerasi con un'elevata capacità di *proofreading* che amplifica entrambi i filamenti del plasmide a partire da due oligonucleotidi sintetici, di cui uno contiene la mutazione di interesse (Tabella 6 ).

I primer sono stati disegnati a coppie compatibili per temperatura di melting ( $T_m$ ) e hanno una lunghezza di circa 40 nucleotidi ciascuno. L'oligonucleotide senso porta la sequenza mutata inserita a metà della lunghezza totale e mantiene la capacità di legarsi specificatamente alla sequenza target; l'oligonucleotide antisenso è sempre wt e presenta una sovrapposizione di circa 20 paia di basi con il rispettivo primer senso.

La reazione di mutagenesi è stata eseguita con il buffer 10X (100 mM KCl; 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 200mM Tris-HCl pH 8.8; 20 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 1% Triton® X-100; 1,0 mg/ml BSA) secondo il seguente protocollo:

DNA	20 ng
Buffer 10X	5.0 $\mu\text{l}$
Primer Forward (10 pmoli/ $\mu\text{l}$ )	2.0 $\mu\text{l}$
Primer reverse (10 pmoli/ $\mu\text{l}$ )	2.0 $\mu\text{l}$
dNTPs mix (10Mm ognuno)	1.25 $\mu\text{l}$
Pfu Turbo (2.5 U/ $\mu\text{l}$ )	1.0 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O bidistillata sterile	↑ volume totale 50 $\mu\text{l}$

Denaturazione iniziale	95° C	30''	} x 15 cicli
Denaturazione	95° C	30''	
Annealing	55° C	1'	
Estensione	68° C	14'	
Estensione finale	68° C	4'	

<b>V158I</b>	<b>FW :</b> 5'-TTGACAGATATCTCGCCATC <u>CAT</u> ACCCCCTTGAAACCACG-3' <b>REV:</b> 5'-GATGGCGAGATATCTGTCAATGGCAATGGCCAGCAAGGC-3'
<b>L173R</b>	<b>FW:</b> 5'-AATTATCAAACGGCCTCCTT <u>CCG</u> GATCGCCTTGGTCTGG-3' <b>REV:</b> 5'-GAAGGAGGCGCTTTGATAATTCATCCGTGGTTTCAAGG-3'
<b>T260M</b>	<b>FW:</b> 5'-AAGGCAGTCCCTGGGTTCCAGAT <u>GG</u> AGCAGATTCGCAAGC-3' <b>REV:</b> 5'-TGGAACCCAGGGACTGCCTTGAACCAGAGCTCCCGGGAG-3'
<b>R268C</b>	<b>FW:</b> 5'-AGCAGATTCGCAAGCGGCTGT <u>GCT</u> GCCGCAGGAAGACG-3' <b>REV:</b> 5'-CAGCCGCTTGCGAATCTGCTCCGTCTGGAACCCAGG-3'
<b>V274D</b>	<b>FW:</b> 5'-CTGCGCTGCCGCAGGAAGACG <u>GAC</u> CTGGTGCTCATGTGC-3' <b>REV:</b> 5'-CGTCTTCCTGCGGCAGCGCAGCCGCTTGCGAATCTGC-3'
<b>V331M</b>	<b>FW:</b> 5'-AACAGCATGATCAACACCGTATGCTTCGTGACGGTCAAG-3' <b>REV:</b> 5'-GGTGTTGATCATGCTGTTGCTCATGGCGATGCACTCGACC-3'
<b>V334M</b>	<b>FW:</b> 5'-ATCAACACCGTATGCTTCA <u>TG</u> ACGGTCAAGAACAAACACC-3' <b>REV:</b> 5'-AAGCATACGGTGTTGATCATGCTGTTGCTCATGGCGATGC-3'

**Tabella 6:** primers utilizzati per la mutagenesi di PROKR2

### DIGESTIONE ENZIMATICA CON DpnI

Dopo verifica su gel di agarosio 1% (vedi sezione “Elettroforesi su gel d’agarosio”), i prodotti di PCR sono stati digeriti con l’enzima di restrizione Dpn I (New England Biolabs) che, riconoscendo la sequenza metilata G<sup>m6</sup>ATC, degrada i templati wt presenti nella reazione (il DNA estratto da E. Coli è infatti metilato) e seleziona il DNA neosintetizzato contenente la mutazione. Il protocollo prevede una digestione di due ore a 37° C utilizzando 17 µl di DNA amplificato, 10 U di Dpn I (10l) e 20l di buffer commerciale relativo NEB 4 (50mM potassio acetato; 20mM Tris-acetato; 10mM magnesio acetato; 1mM DTT pH=7,9 a 25°C) (New England Biolabs). Successivamente la reazione di digestione è stata precipitata con sodio acetato ed etanolo 100%, secondo il protocollo descritto nella sezione “Precipitazione del DNA”. Il DNA precipitato è stato trasformato in batteri elettrocompetenti e seminato su LB-Agar con Ampicillina (sezione “Trasformazione per elettroporazione”).



## SCREENING DEI CLONI MUTATI PER DIGESTIONE ENZIMATICA

I cloni positivi che hanno incorporato il plasmide mutato e, con esso, la resistenza all'Ampicillina, sono stati screenati mediante digestione enzimatica dei prodotti di amplificazione per discriminare i cloni mutati da quelli wt. Le colonie selezionate dalle piastre di LB-Agar con Ampicillina sono state fatte crescere in LB, come da protocollo descritto nella sezione "PCR sul medium di cultura batterica" e amplificate seguendo lo schema di "Amplificazione genica", utilizzando i primer riportati in tabella 6. Sfruttando la specificità di riconoscimento della sequenza da tagliare degli enzimi di restrizione, è stato possibile eseguire un primo screening dei differenti cloni mediante digestioni enzimatiche, in quanto la PCR di mutagenesi causava l'eliminazione o l'inserimento di siti di taglio nei costrutti mutanti rispetto al rispettivo DNA originario. Si veda la tabella seguente (Tabella 7) per l'elenco degli enzimi di restrizione utilizzati nei nostri esperimenti, per le loro sequenze riconosciute specificatamente e per le condizioni di temperatura e buffer utilizzati.

Mutazione	Enzima	Sequenza	Buffer	Temperatura
V158I	HpHI	GGTGA(N) <sub>8</sub>	NEB4	37° C
L173R	HpaII	CCGG	NEB1	37° C
R268C	HhaI	GCGC	NEB4 + BSA	37° C
V331M	DraIII	CACNNNGTG	NEB3 + BSA	37° C
V334M	RcaI	TCATGA	NEB4	37° C

**Tabella 7:** enzimi di restrizione utilizzati per lo screening dei mutanti di PROKR2 N=purina o pirimidina

I cloni risultati positivi allo screening mediante digestione enzimatica sono stati successivamente verificati mediante reazione di sequenza (sezione "Screening per sequenziamento"). I mutanti per cui non era possibile effettuare uno screening tramite digestione enzimatica, poiché le mutazioni non inserivano/toglievano alcun sito di restrizione, sono stati screenati direttamente tramite sequenziamento automatico.

## SUBCLONAGGIO

Per ovviare il possibile inserimento di mutazioni random nel vettore da parte della Taq polimerasi, è stato deciso di spostare tutto il cDNA di PROKR2 contenente la mutazione di interesse in un vettore pulito, in modo da evitare il sequenziamento dell'intero costrutto mutagenizzato. A tal fine sono stati scelti gli enzimi di

restrizione già utilizzati per il primo subclonaggio. A seguito del sequenziamento di tutto il cDNA di PROKR2 contenente la mutazione di interesse, il mutante e un plasmide wt sono stati sottoposti a digestione enzimatica con EcoRI e BamHI, secondo il protocollo già descritto (sezione “Digestione enzimatica per subclonaggio”). I prodotti della digestione sono stati fatti correre su gel di agarosio per separare i due frammenti ottenuti. Successivamente è stata tagliata da gel la banda di interesse del costrutto mutato ed è stata sostituita nel costrutto wt mediante ligazione (sezione “Ligazione”). Il DNA ligato è stato trasformato in batteri elettrocompetenti e seminato su LB-Agar con Ampicillina (sezione “Trasformazione per elettroporazione”). I cloni sono stati *screenati* mediante PCR e restrizione enzimatica e successivamente confermati con una reazione di sequenza (sezione “Screening dei cloni ligati”). Infine il costrutto di interesse è stato amplificato e purificato mediante Maxi-PREP (Sezione “MAXIPREP”).

## STUDI FUNZIONALI

### COLTURE CELLULARI

Per l'esecuzione di studi funzionali *in vitro*, i costrutti mutati e wt sono stati inseriti mediante un protocollo di transfezione transiente all'interno di una linea cellulare scelta come sistema per far produrre la proteina d'interesse con un'alta efficienza. Le linee cellulari utilizzate sono le HEK 293 e le CHO.

Tali cellule vengono mantenute in coltura a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, in piastre da 10 cm in terreno DMEM+GlutaMAX™-I (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) addizionato con 10% FBS (*fetal bovine serum*, siero bovino fetale, Gibco), 1% Pen:Strep e 1% Fungizone.

### TRANSFEZIONE CON LIPOFECTAMINA

La transfezione è una tecnica che consente di introdurre DNA plasmidico in cellule eucariotiche, al fine di indurre tali cellule ad esprimere la proteina codificata dal DNA esogeno. Nel caso della transfezione transiente il DNA non viene integrato nel genoma cellulare, ma rimane in forma episomale: la sequenza codificante per la proteina d'interesse viene trascritta e tradotta e, dopo 48 o 72 ore dalla transfezione, le cellule possono essere trattate per l'esperimento voluto.

Il protocollo di transfezione si suddivide in 4 giorni:

1. Giorno 0:

- piastrare 2.000.000 di cellule HEK 293 in piastre da 10 cm

## 2. Giorno 1:

- preparare la MIX A risospendendo 5 µg di DNA plasmidico in un volume finale di 250 µl di OPTIMEM, da moltiplicare per le piastre da transfettare, e lasciare a temperatura ambiente per 5'
- preparare la MIX B risospendendo 10 µl di LIPO 2000 in un volume finale di 250 µl di OPTIMEM, da moltiplicare per le piastre da transfettare, e lasciare a temperatura ambiente per 5'
- unire la MIX B sulla MIX A e lasciare a temperatura ambiente per 15'
- lavare le piastre almeno una volta con 5 ml OPTIMEM
- aggiungere 10 ml di OPTIMEM in ciascuna piastra
- aggiungere ad ogni piastra 500 µl di MIX A+B e lasciare in incubazione *overnight*

## 3. Giorno 2:

- splittare le cellule transfettate in una piastra da 3.5 cm ad una concentrazione finale di 300.000 cellule/piastra, per l'analisi al FACS
- splittare le cellule transfettate in una *multiwell* da 96 pozzetti ad una concentrazione finale di 200.000 cellule/pozzetto, per la determinazione del cAMP intracellulare
- splittare le cellule transfettate in in una *multiwell* half-area da 96 pozzetti bianca per HTRF (*Homogeneous Time Resolved Fluorescence*) ad una concentrazione finale di 200.000 cellule/pozzetto, per la determinazione dell'IP1

## 4. Giorno 3:

- eseguire gli studi funzionali

Ogni esperimento è stato condotto in duplicato ed è stato ripetuto almeno due volte. Le cellule transfettate con il vettore vuoto sono state impiegate come controllo negativo.

## FACS

L'acronimo FACS sta per *Fluorescent-Activated Cell Sorter*: le cellule in sospensione monodisperse scorrono in singola fila attraverso un punto d'interrogazione illuminato da un raggio laser, dove riflettono luce ed emettono fluorescenze che vengono raccolte, filtrate e convertite in segnali digitali che vengono elaborati e memorizzati.

Le cellule transfettate transientemente con i diversi DNA d'interesse secondo la modalità descritta in precedenza, sono state preparate per l'analisi al citofluorimetro FACScalibur™ (Becton Dickinson) secondo il seguente protocollo:

- aspirare il terreno da ogni piastra
- aggiungere 1 ml di EGTA(5mM)/EDTA(5mM)/PBS
- staccare le cellule dalle piastre aiutandosi con una pipetta
- trasferire ogni campione in un tubo di polistirene intestato
- aggiungere a ogni tubo 2 ml di PBS BSA 0.1% Na<sup>+</sup> Azide 0.1%
- centrifugare a 560xg per 3'
- scartare il surnatante per decantazione
- aggiungere a ogni tubo 100 µl di soluzione con anticorpo I (25 µl MAb anti-RT + 75 µl PBS-BSA-Azide) e vortexare brevemente. Il MAb anti-RT, prodotto in topo, ci è stato gentilmente concesso dalla Dr.ssa Sabine Costagliola (IRIBHM, ULB, Bruxelles, Belgium)
- incubare per 30' a temperatura ambiente
- lavare con 2 ml PBS-BSA-Azide
- aggiungere a ogni tubo 100 µl di soluzione con anticorpo II (1 µl Ab goat anti-mouse + 10 µl propidio ioduro + 89 µl PBS-BSA-Azide) e vortexare
- incubare per 30' in ghiaccio al buio
- lavare con 2 ml PBS-BSA-Azide
- risospendere ogni campione in 250 µl PBS-BSA-Azide freddo e vortexare
- leggere i campioni al FACS

## PERMEABILIZZAZIONE

Questa fase viene fatta in maniera successiva ed opzionale al FACS, successivamente alla fase di fissaggio.

- Aggiungere 400 µl di PBS-BSA 0.1% Na azide + saponina 0.2%
- Vortexare
- Incubare 30' RT
- Aggiungere 4 ml PBS-BSA-Azide
- Centrifugare 3' a 1800 rpm a 4°C
- Decantare il surnatante
- Procedere con l'immunoreazione come da protocollo del FACS

## QUANTIZZAZIONE DEL cAMP

Le cellule transfettate sono state stimulate con la prokineticina 2 (PROK2) ricombinante umana purificata (Fitzgerald Industries International) a dosi crescenti e in seguito è stato dosato l'AMP ciclico (cAMP) intracellulare accumulato a seguito della stimolazione.

## CURVE CONCENTRAZIONE EFFETTO

Per la stimolazione della produzione di cAMP da parte delle cellule transfettate sono state condotte delle classiche curve concentrazione-effetto al fine di poter definire il profilo farmacologico dei costrutti generati, secondo il seguente protocollo:

- aspirare il terreno da ogni pozzetto della *multiwell*
- aggiungere 100 µl di Krebs-Ringer-Hepes buffer (KRH)
- incubare per 30' a 37° C in un bagnetto
- aggiungere 100 µl della soluzione di stimolo (KRH + 25 µM di inibitore delle fosfodiesterasi Rolipram + concentrazioni crescenti di PROK2)
- incubare per 1 ora a 37° C in un bagnetto
- aspirare il surnatante
- aggiungere 100 µl di HCl 0.1 M per lisare le cellule e permettere il rilascio del cAMP intracellulare
- incubare per 20' a temperatura ambiente
- trasferire il surnatante in tubi di vetro intestati
- lavare i pozzetti con 100 µl di H<sub>2</sub>O e trasferire tutto nei tubi corrispondenti
- essiccare gli estratti cellulari in un concentratore a vuoto
- risospendere gli estratti in 1 ml di H<sub>2</sub>O e diluirli in modo appropriato per la valutazione del cAMP

Le concentrazioni di PROK2 usate per la stimolazione delle cellule HEK 293 transfettate sono riassunte in tabella 8.

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
medium	1x10 <sup>-11</sup> M	1x10 <sup>-10</sup> M	5x10 <sup>-10</sup> M	1x10 <sup>-9</sup> M	5x10 <sup>-9</sup> M	1x10 <sup>-8</sup> M	5x10 <sup>-8</sup> M	1x10 <sup>-7</sup> M	5x10 <sup>-7</sup> M

**Tabella 8:** concentrazioni crescenti di PROK2 utilizzate per la stimolazione

## DOSAGGIO DEL cAMP

Si tratta di un metodo radioimmunometrico che si basa sulla competizione tra il cAMP contenuto nei campioni da dosare e un cAMP marcato con <sup>125</sup>I per il legame con un anticorpo commerciale specifico anti-cAMP. Il metodo è stato messo a punto

nei laboratori della Université Libre de Bruxelles (ULB) in Belgio e si basa sul metodo di Brooker (Brooker et al, 1979).

A) PREPARAZIONE DELLA CURVA STANDARD La curva standard è stata preparata diluendo una piccola quantità di cAMP commerciale (1M) in H<sub>2</sub>O (Tabella 9).

STD:	0	1	2	3	4	5	6	7	8
	Zero	5x10 <sup>-11</sup> M	1x10 <sup>-10</sup> M	2,5x10 <sup>-10</sup> M	5x10 <sup>-10</sup> M	1x10 <sup>-9</sup> M	2,5x10 <sup>-9</sup> M	5x10 <sup>-9</sup> M	1x10 <sup>-8</sup> M

**Tabella 9:** concentrazioni per la curva standard del cAMP

B) DILUIZIONE DEI CAMPIONI DA DOSARE

I campioni risospesi in acqua sono stati diluiti opportunamente perché risultino nella parte di massima pendenza della curva standard.

C) ACETILAZIONE

L'acetilazione dei campioni e degli standard è in grado di aumentare l'affinità per l'anticorpo anti-cAMP di 40-100 volte:

- aggiungere ai campioni 20 µl di KOH 2N e vortexare brevemente
- aggiungere 5 µl di anidride acetica (MERK) e vortexare brevemente
- incubare per 30' a temperatura ambiente

D) RADIOIMMUNOASSAY

- aggiungere ai campioni 200 µl di Tampone Imidazolo (Imidazolo 100mM, Acetato pH=7, 1mM EDTA)
- trasferire ciascun campione in due tubi di plastica per il saggio del cAMP (Greiner)
- aggiungere 50 µl di soluzione tracciante (<sup>125</sup>I-cAMP circa 15000 cpm/tubo, BSA 0,01%, Tp acetato)
- aggiungere 100 µl di soluzione contenente l'anticorpo (Rabbit anti-cAMP, Calbiochem) (Ab αcAMP ; BSA 0,01%, γIgG 0,1% in Tp acetato)
- incubare *overnight* a 4° C
- precipitare i complessi formati aggiungendo 1.2 ml di isopropanolo freddo
- incubare per 40' a 4° C

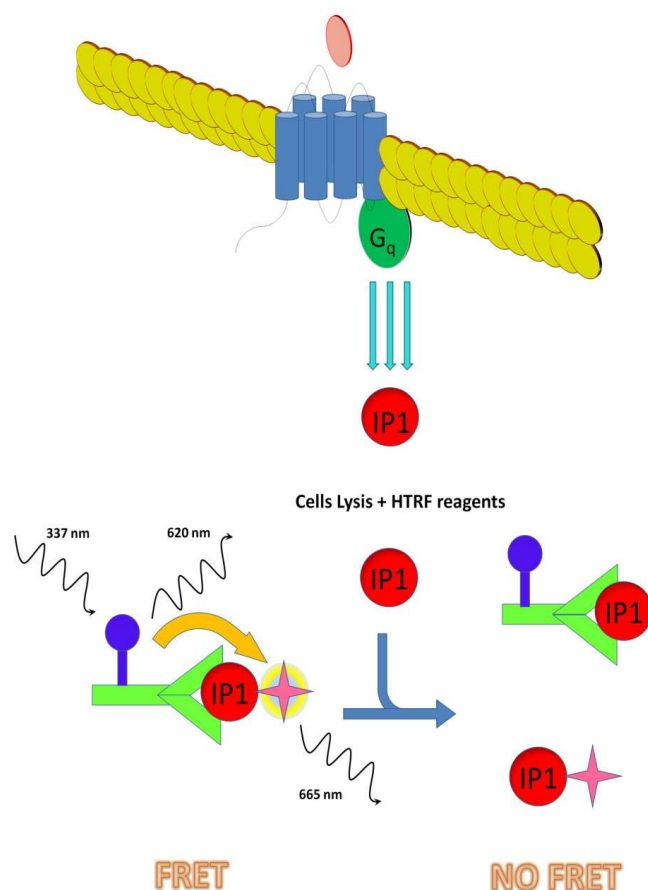
- centrifugare a 3000xg per 30' a 4° C
- decantare i tubi
- analizzare il pellet dei campioni al  $\gamma$  counter (Cobra™ II, Packard)

Gli esperimenti sono stati condotti almeno in duplicato. I risultati sono stati espressi in picomoli di cAMP/ml. Le curve concentrazione-effetto sono state elaborate con il programma informatico Prism® (GraphPad Software) ed è stata determinata l'EC50 (*Effective Concentration*).

## QUANTIZZAZIONE DELL'IP1

Parallelamente alla quantizzazione del cAMP, è stato condotto un saggio per l'IP1 in cui le cellule transfettate sono state stimulate con dosi crescenti di prokineticina 2 (tabella 8) e in seguito è stato dosato l'IP1 intracellulare accumulato a seguito della stimolazione.

Il dosaggio dell'IP1 è stato effettuato tramite il kit HTRF® IP-One (Cisbio), un saggio basato sulla FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) in cui, dopo il legame tra l'anticorpo anti-IP1 marcato con il donatore europio criptato e l'IP1 marcato con l'accettore d2, si assiste al fenomeno di trasferimento energetico tra i fluorofori e all'emissione della fluorescenza ( $\lambda=665$  nm). L'IP1 contenuto nei campioni da dosare compete con l'IP1 marcato per il legame con l'anticorpo specifico e blocca la FRET, causando una diminuzione della fluorescenza emessa.



**Figura 14:** HTRF-FRET IP1

La curva standard è stata preparata diluendo una piccola quantità di IP1 Calibrator, fornito nel kit, nello Stimulation Buffer .

STD:	0	1	2	3	4	5	6
	Zero	21.5 nM	86 nM	344 nM	1.375 nM	5.500 nM	20.000 nM

Il protocollo della valutazione dell'IP1 è il seguente:

- aspirare il terreno da ogni pozzetto della *multiwell*
- aggiungere 50 µl della soluzione di stimolo (IP1 Stimulation Buffer + concentrazioni crescenti di PROK2)
- incubare per 30' a 37° C
- aggiungere 25 µl di soluzione IP1-d2, contenente l'IP1 marcato disciolto 1/100 nel Conjugate&Lysis Buffer
- aggiungere 25µl di soluzione anti-IP1 cryptate, contenente l'anticorpo anti-IP1 marcato disciolto 1/100 nel Conjugate&Lysis Buffer
- incubare per 1 ora a temperatura ambiente



- leggere i campioni al lettore HTRF

Gli esperimenti sono stati condotti almeno in duplicato. I risultati sono stati espressi in IP1 nM. Le curve concentrazione-effetto sono state elaborate con il programma informatico Prism® (GraphPad Software) ed è stata determinata l'EC50 (*Effective Concentration*).

## CALCOLO DELLO SCORE FUNZIONALE

Partendo dal presupposto che la via cAMP e la via IP1 abbiano pari importanza nel funzionamento del recettore, abbiamo cercato di integrare in uno score i risultati ottenuti dagli studi *in vitro* relativi al funzionamento e all'espressione delle differenti varianti attraverso la seguente formula matematica:

$$(1/A + 1/B) \times C$$

A= cAMP EC<sub>50</sub> variante/cAMP EC<sub>50</sub> wt

B= IP1 EC<sub>50</sub> variante/IP1 EC<sub>50</sub> wt

C= espressione al FACS (espressa come fold del wt)

## HOMOLOGY MODELLING DI PROKR2

Per fare il modello per omologia di PROKR2 è stato usato il template del recettore beta2-adrenergico per quanto riguarda la parte delle eliche transmembrana (TMH), mentre il secondo loop extracellulare è stato modellato sulla struttura della rodopsina. Il modello così creato rappresenta la conformazione inattiva del recettore.

## SNPs E CNVs GENOTYPING

### PREPARAZIONE DEI CAMPIONI ED IBRIDAZIONE SU CHIP ILLUMINA®

Per ogni paziente sono stati utilizzati ai fini dell'ibridazione 250 ng totali di DNA genomico, precedentemente controllato per saggiarne la qualità allo spettrofotometro e su gel di agarosio all'1%. Il chip utilizzato è il Human660W-Quad BeadChip dell'ILLUMINA®; questo vetrino contiene 660.000 sonde dedicate agli SNPs e 100.000 sonde dedicate ai CNVs.

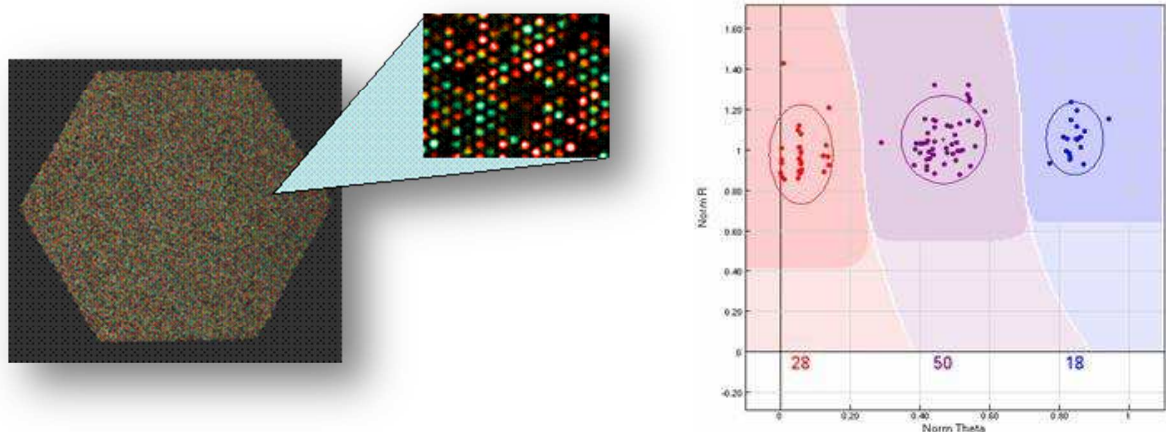


**Figura 15:** Chip Illumina

## CONTROLLO DI QUALITA' DEI DATI

I dati grezzi ottenuti dall'acquisizione dei dati di fluorescenza dal chip Illumina sono stati processati dal programma Illumina Genome Studio. In questa fase tutti i segnali di fluorescenza per ogni singolo SNPs vengono clusterizzati e poi gli viene assegnato un genotipo (AA,AB,BB); mentre per le sonde dedicate ai CNVs gli viene assegnato un valore numerico (0,1,2,3,4).

I *software* da noi utilizzati per l'analisi/visualizzazione dei dati sono: BeadStudio, GenomeStudio, pLINK e GoldenHelix software.



**Figura 16:** A) Dati grezzi di fluorescenza letti dal BeadReader Illumina® B) Clustering di SNP.

I controlli di qualità effettuati sono i seguenti:

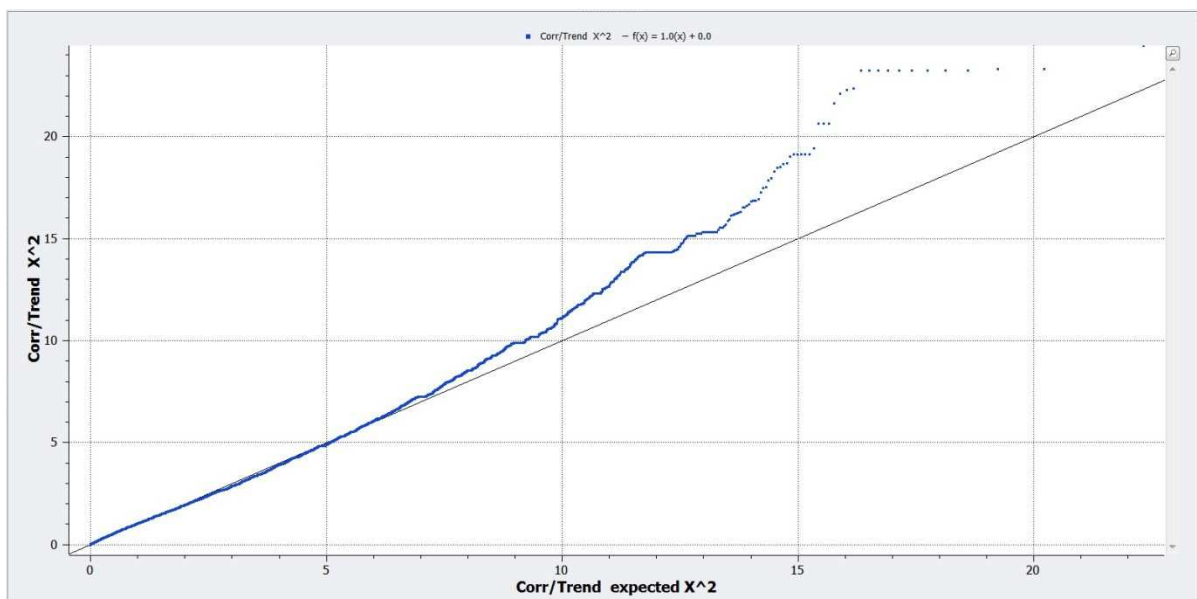
1. Controllo di qualità degli SNPs, in base al Call Rate (cioè alla percentuale di SNPs letti tecnicamente bene) si escludono i campioni che hanno un CR <

0.95; nel nostro caso tutti i campioni analizzati hanno superato i controlli di qualità, mentre 4 campioni del gruppo dei controlli sono stati esclusi.

2. Controllo relativo al sesso dei campioni per validare informaticamente le informazioni relative ai campioni. Ciò nel nostro caso è indispensabile nel caso dei controlli, in quanto in molti casi non abbiamo informazioni sugli stessi; mentre per i pazienti ICH questo procedimento serve per escludere la presenza di eventuali anomalie cariotipiche. La determinazione del sesso viene effettuata valutando il tasso di eterozigosità dei cromosomi sessuali. (circa 0 = M; diverso da 0 = F)
3. Identificazione e rimozione degli *outliers*. In questa fase si analizza il tasso di eterozigosità dei cromosomi autosomici e si escludono tutti i campioni che non superano il valore soglia di 0.25. Questo procedimento consente di eliminare dalle analisi successive tutti quei campioni che potrebbero creare un *bias*, generando falsi positivi.
4. *Identity by descent* (identità per discendenza): questa analisi consente di verificare i rapporti di parentela presenti all'interno della casistica, eventuali consanguineità e la presenza di campioni ripetuti nel gruppo di controllo. Ciò viene fatto valutando la matrice di similarità dei campioni che viene generata dall'algoritmo IBS. (1 = identità, gemelli monozigoti; 0,5 = genitore-figlio, fratelli; 0,25 = nonno-nipote; zio-nipote; 0.125 = cugini)
5. La stratificazione di popolazione viene effettuata facendo l'analisi delle componenti principali sul genotipo dei pazienti e consente di verificare se tutti i campioni analizzati sono etnicamente omogenei e di correggere quindi le successive analisi per questo dato. I valori ottenuti dalla PCA possono poi essere successivamente utilizzati per individuare dei sottogruppi che correlino con i tratti quantitativi dei pazienti ICH. In questo caso viene anche fatto un secondo controllo per la presenza di outliers, ponendo come valore soglia 1.5.
6. Filtraggio per i valori di qualità dei singoli SNPs. Per evitare di avere dati distorti da SNPs con valori di fluorescenza anomala, tutte le posizioni vengono valutate per  $CR > 0.9$ ;  $MAF > 0.001$ ; filtraggio HWE (Hardy-Weinberg equilibrium) basato sui controlli; test esatto di Fisher per gli HWE p-value  $> 1e-4$ .

## Q-Q PLOT

Questo grafico rappresenta la distribuzione dei valori osservati di significatività, confrontati con quelli attesi. Se i dati si distribuiscono lungo la diagonale allora essi sono normali in senso statistico e quindi verosimilmente non discostandosi dall'atteso potrebbero rappresentare dei falsi positivi. Dal nostro Q-Q plot sembra che i dati inizino a essere significativamente interessanti per valori di  $-\log_{10} P$  superiori a 7.



**Figura 17:** Q-Q plot per la stima della presenza dei falsi positivi negli SNPs analizzati

## IDENTIFICAZIONE E COMPARAZIONE DEI CNVs

I chip Quad-660W Illumina® contengono al loro interno 100.000 sonde dedicate ai CNVs, però andando a valutare con degli specifici algoritmi l'intensità di fluorescenza delle sonde per gli SNPs è possibile determinare per via indiretta il numero di copie associato a ogni SNP. Noi abbiamo utilizzato l'algoritmo CNVpartition 3.1.6 per effettuare questo procedimento. Le impostazioni utilizzate sono: valore soglia di 70, rilevazione delle zone di eterozigosità, valutazione dei cromosomi sessuali, numero minimo di probe in una zona di CNVs uguale a 10, ampiezza minima delle zone di eterozigosità 100000 bp.

Le analisi caso/controllo effettuate con pLINK sono state fatte analizzando CNVs di ampiezza 20, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 5000 kb. Per ridurre il rischio di identificare falsi positivi, l'analisi è stata fatta utilizzando come correzione un procedimento di permutazione, (in cui in maniera random vengono scambiati dei casi con dei controlli) che prevede 50000 scambi.

## ANALISI LOH (*Loss Of Heterozygosity*)

Per l'identificazione delle zone in perdita di eterozigotà (LOH) sono stati utilizzati i plugin *LOH detector* e *LOH score* per il BeadStudio Illumina®. La combinazione di questi due strumenti consente l'identificazione delle zone LOH e l'attribuzione di punteggi di eterozigotà che poi verranno utilizzati per la comparazione, all'interno delle famiglie, fra casi e controlli. Il valore soglia di *LOH score* per cui vengono considerate significative le zone LOH dei casi è di 10, mentre nei controlli viene settato a 0, per aumentare la stringenza dell'analisi. I geni candidati sono stati quindi ottenuti valutando tutte le zone in perdita di eterozigotà presenti nei pazienti affetti e non presenti in familiari sani.

## ANALISI SNPs

L'analisi multivariata degli SNPs è stata effettuata tramite il programma Golden Helix® dopo aver effettuato i controlli di qualità come descritto nel tutorial [http://doc.goldenhelix.com/SVS/tutorials/snp\\_gwas/index.html](http://doc.goldenhelix.com/SVS/tutorials/snp_gwas/index.html), utilizzando i settaggi di default. I *loci* candidati identificati sono stati ottenuti, tramite un test di associazione (utilizzando un modello additivo) e i valori di  $-\log_{10} P$  identificati sono stati graficati su un Manhattan Plot, sempre utilizzando le impostazioni di default.

# *Risultati*

**CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DI  
MUTAZIONI A CARICO DEL GENE PROKR2:  
BLOCCO IN DUE DIFFERENTI VIE DI  
TRASDUZIONE DEL SEGNALE**

## SCREENING GENETICO DI PROKR2

Lo screening del gene PROKR2 è stato effettuato su una coorte composta da 217 pazienti ICH provenienti da diversi centri di raccolta a livello nazionale. Mediante la metodica del sequenziamento automatico, sono state individuate 9 varianti del gene PROKR2 in pazienti tra loro non correlati (Tabella 10).

I dai clinici dei pazienti sono riassunti nella seguente tabella:

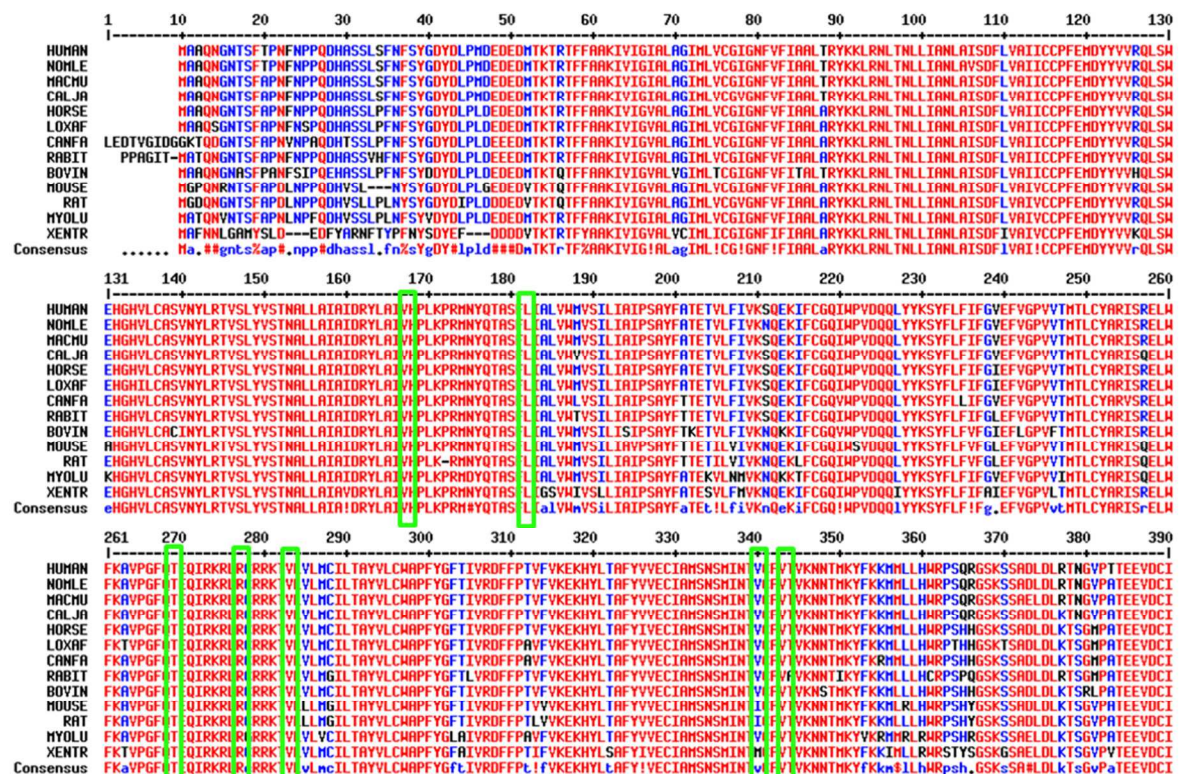
ID paziente e diagnosi	Variante		Sesso	Familiarità	Note
KS/nIHH	Gene	Proteina			
KS-1	c.472 G>A	V158I E	M	Anosmia in nonna materna	sorella con sdr. Angelman; Età ossea ritardata di 3aa alla dg.
KS-2	c.518 T>G	L173R E	M	No	Criptorchidismo monolaterale corretto chirurgicamente; osteopenia; Variante <b>IVS 17-6 C&gt;T</b> in eterozigosi nel gene FGFR1; Madre con medesimo genotipo ma fenotipo normale.
nIHH-1	c.779 C>T	T260M E	M	No	Criptorchidismo bilaterale. Padre con uguale genotipo ma fenotipo normale.
nIHH-2	c.802 C>T	R268C E	M	No	---
	c.820 T>A	V274D O	M	No	Genitori consanguinei (primi cugini);
nIHH-3	c.991 G>A	V331M E	M	No	Dm tipo 2; sovrappeso; azoospermia; 1 nipote con criptorchidismo monolaterale.
nIHH4	c.1000 G>A	V334M E	F	No	Madre con uguale genotipo ma fenotipo normale.
nIHH-5	c.1000 G>A	V334M E	M	No	Variante <b>C383FfsX1</b> in eterozigosi nel gene PROK2. Padre con uguale genotipo ma fenotipo normale.

**Tabella 10:** Dati clinici e genetici dei pazienti portatori di varianti del gene PROKR2



Le mutazioni 20fsX43, L173R, R268C, V274D e V331M erano già state descritte precedentemente in letteratura, mentre le mutazioni 15fsX45, V158I, T260M e V334M sono state individuate per la prima volta nel corso delle nostre analisi. Fatta eccezione per la variante V274D che è presente in omozigosi, tutte le altre si presentano invece in eterozigosi. Nessuno dei pazienti è risultato portatore di altre varianti nei geni candidati analizzati (FGFR1, FGF8, PROK2, GnRH1/2, GnRHR, KISS1R/GPR54, TACR3, TAC3), ad eccezione del caso KS-2 in cui abbiamo identificato anche una variante intronica nel gene FGFR1 che è potenzialmente coinvolta in un alterato *splicing* della proteina matura e del caso nIHH5 che mostra una variante anche a carico del gene PROK2, suggerendo una patogenesi oligogenica di ICH (vedi Tabella 10).

Al fine di verificare se i residui, in cui sono state identificate le mutazioni a carico di PROK2 nella nostra casistica, fossero conservati a livello evolutivo ed in seconda analisi a livello strutturale, è stato fatto un allineamento strutturale degli omologhi del PROK2 umano.

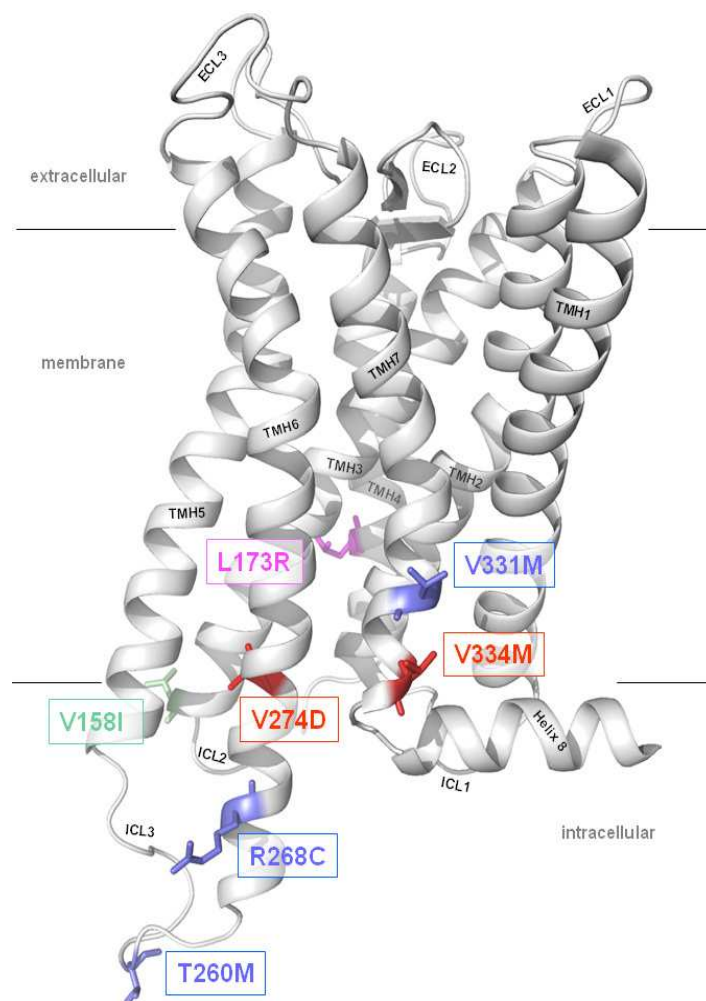


**Figura 18:** Allineamento multiplo delle sequenze di diverse specie di PROK2. In verde sono identificate le varianti identificate nei nostri pazienti, nell'ordine V158I, L173R, T260M, R268C, V274D, V331M, V334M. Le sequenze proteiche utilizzate sono depositate nella banca dati <http://www.uniprot.org/>. Il programma utilizzato per gli allineamenti è Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Specie analizzate: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, *Canis familiaris*, *Equus caballus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Loxodonta africana*, *Macaca mulatta*, *Xenopus tropicalis*, *Callithrix jacchus*, *Nomascus leucogenys*, *Myotis lucifugus*

Dall'allineamento risulta evidente che c'è una forte conservazione strutturale del gene PROKR2, sia lungo l'ordine dei mammiferi che quello di altri ordini evolutivamente meno vicini all'uomo. Come indicato nella figura le varianti genetiche di PROKR2 identificate nella nostra casistica risultano essere a carico di residui altamente conservati nelle specie analizzate.

## ANALISI BIOINFORMATICA DELLE VARIANTI GENETICHE INDIVIDUATE NEL GENE PROKR2

Al fine di valutare *in silico* l'effetto biologico di queste varianti, ci siamo avvalsi della collaborazione del Dr. Gunnar Kleinau che ha creato una struttura tridimensionale di PROKR2 tramite la tecnica del modello per omologia (*homology modelling*), usando la struttura del recettore  $\beta$ 2-adrenergico come template per lo *scaffold* principale, e quella della Rodopsina per il loop extracellulare 2 (EL2) (vedi figura 19). All'interno di questo modello sono state inserite le varianti individuate.



**Figura 19:** modello per omologia del recettore Prokr2. In evidenza tramite *sticks* sono riportate le posizioni wild-type delle mutazioni identificate: V158 sulla TMH3 (*transmembrane helix 3*), L173 sulla TMH4 (*transmembrane helix 4*), T260 sul loop intracellulare 3 (ICL3), R268 e V274 sulla TMH6

(*transmembrane helix 6*), V331 e V334 sulla TMH7 (*transmembrane helix 7*). In relazione al loro effetto sulla trasduzione del segnale i residui sono stati colorati in maniera differente: verde = nessuna o scarsa inattivazione della trasduzione via cAMP o via IP3; rosa = inattivazione del cAMP signaling; blu = inattivazione via dell'IP3; rosso = inattivazione di entrambe le vie di trasduzione del segnale.

Dalle analisi strutturali risulta evidente che le mutazioni V331M e V334M occorrono in un motivo evolutivamente conservato nella maggior parte dei recettori accoppiati a proteina G, il cosiddetto motivo NPXXY, uno *ionic-lock*. Tale motivo è noto essere coinvolto nell'interazione proteina-proteina e nella determinazione dello stato di conformazione attiva/inattiva del dominio transmembrana.

I residui T260, R268 e V274 appaiono invece localizzati in una porzione del recettore verosimilmente coinvolta nel reclutamento e attivazione delle proteine G accoppiate al recettore. Pertanto le varianti a carico di questi residui potrebbero alterare la via di trasduzione del segnale.

## STUDI FUNZIONALI

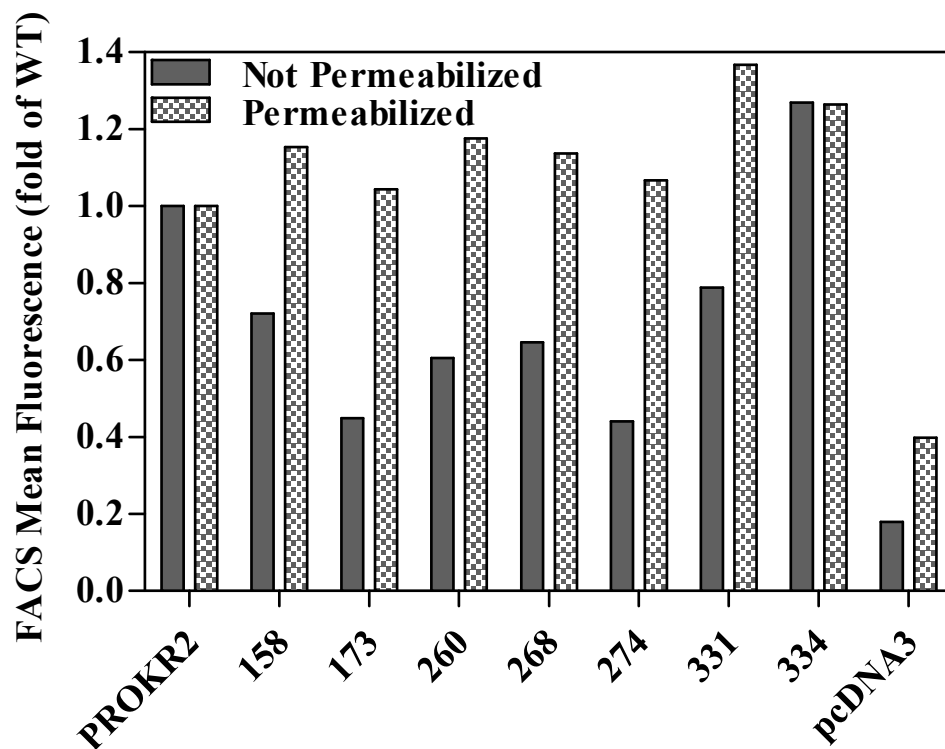
Al fine di caratterizzare in vitro le mutazioni trovate nei nostri pazienti, abbiamo generato dei plasmidi contenenti il recettore PROKR2 wt e mutato (capitolo "Materiali e Metodi"). Tali plasmidi ci hanno permesso di studiare l'espressione in membrana dei diversi costrutti e il loro profilo farmacologico mediante curve concentrazione-effetto con misurazione dell'accumulo di cAMP e IP3 in opportuni sistemi cellulari. Le mutazioni 15fsX45 e 20fsX43 sono per loro natura delle varianti patogenetiche che determinano la produzione di una proteina trunca priva del dominio trans membrana. Per tale motivo non sono state incluse nelle varianti sottoposte a studio funzionale.

### FACS ANALISI: valutazione dell'espressione in membrana

Abbiamo valutato l'espressione in membrana dei costrutti plamidici riportanti le varianti genetiche di PROKR2 individuate mediante trasfezione transiente in cellule HEK-293 e successivi studi di citofluorimetria di flusso. Tale analisi è stata possibile grazie all'uso di un anticorpo monoclonale specifico (donazione della Dr.ssa Sabine Costagliola, IRIBHM, ULB, Bruxelles) diretto contro un Tag di Rodopsina (RT) opportunamente clonato in frame alla prozione N-terminale dei nostri costrutti.

Tutte le varianti analizzate mostrano una riduzione dell'espressione in membrana rispetto al recettore *wild-type*, ad eccezione della mutazione V334M che presenta una espressione lievemente eccedente quella del recettore *wt*. Le varianti L173R e V274D risultano maggiormente compromesse con dei livelli di espressione ridotte a circa la metà del *wt* (vedi figura 20).

Al fine di valutare se le differenze di espressione in membrana fossero dovute a una mancata traduzione della proteina o a una alterata stabilità/ targeting in membrana, abbiamo eseguito anche valutazioni al FACS di cellule trasfettate e successivamente permeabilizzate con saponina. I dati ottenuti dopo permeabilizzazione mostrano chiaramente che i livelli totali di fluorescenza, intra ed extracellulari dei costrutti, sono tra loro paragonabili ed uguali a quelli del recettore *wt* (vedi figura 20). Ciò dimostra che le differenze osservate nelle cellule non permeabilizzate (vedi figura 20) non sono dovute ad un'alterata produzione della proteine mutanti ma ad alterazioni a carico dei processi di *folding*, di modificazione post-traduzionale, di *quality control* e di trasporto in membrana delle stesse. Le varianti del recettore con una maggiore riduzione di espressione in membrana sono la L173R e la V274D.



**Figura 20:** analisi FACS delle cellule trasfettate in maniera transiente permeabilizzate e non permeabilizzate. I dati sono espressi come rapporto dell'espressione del recettore *wt*. Il vettore pcDNA3 vuoto è stato analizzato come controllo negativo ed è indicativo dei valori di fluorescenza basale. L'esperimento è rappresentativo di altri 3 esperimenti che hanno riprodotto gli stessi dati.

In tabella 11 sono riassunti i risultati dell'analisi al FACS, come percentuale di espressione rispetto al recettore *wt*.

Mutante	Espressione: cellule non permeabilizzate (fold of wt)	Espressione: cellule permeabilizzate (fold of wt)	Mutante	Espressione: cellule non permeabilizzate (fold of wt)	Espressione: cellule permeabilizzate (fold of wt)
wt	1,00	1,00	R268C	0,65	1,14
V158I	0,72	1,15	V274D	0,44	1,07
L173R	0,45	1,04	V331M	0,79	1,37
T260M	0,61	1,18	V334M	1,27	1,26

**Tabella 11:** valori di espressione ottenuti all'analisi al FACS dei diversi mutanti

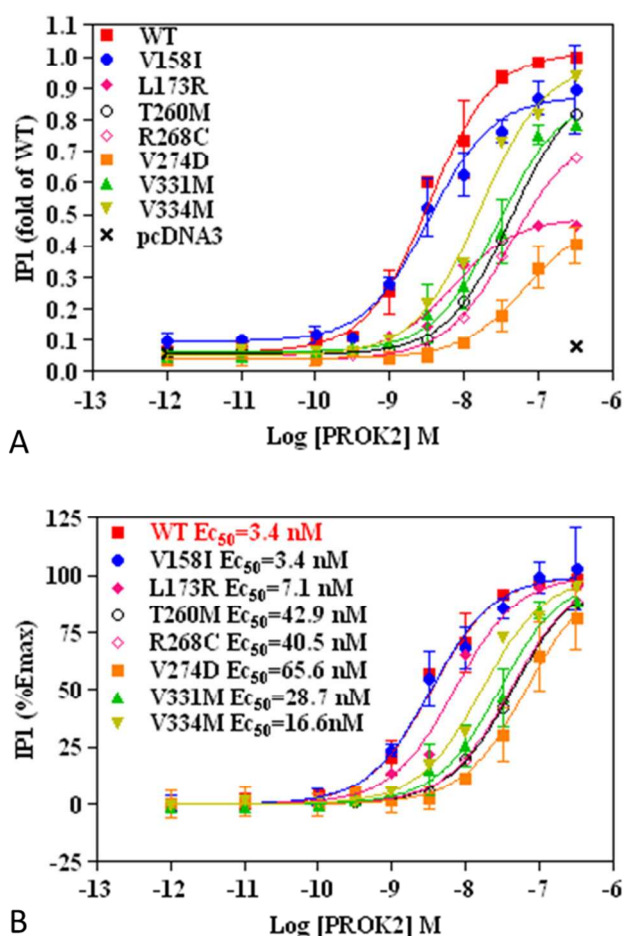
## CURVE CONCENTRAZIONE-EFFETTO PER IP1

Come primo saggio funzionale abbiamo valutato la produzione di IP1, un metabolita intermedio dell'attivazione della via  $\text{Ca}^{2+}$ /IP3 via proteina  $\text{G}_{q/11}$ . Mediante la stimolazione dei costrutti generati con dosi crescenti di ligando (vedi Materiali e Metodi), abbiamo ottenuto delle curve concentrazione-effetto che mostrano il differente comportamento funzionale delle varianti allo studio.

I livelli basali di IP1 risultano essere simili per tutte le varianti di PROKR2. La variante V158I ha un profilo farmacologico del tutto sovrapponibile a quello del recettore *wt* in termini di  $\text{E}_{\text{max}}$  ( $89.5 \pm 14.0\%$  rispetto al *wt*) e di  $\text{EC}_{50}$  (3.4 nM). Le varianti L173R e V334M mostrano invece un lieve aumento in termini di  $\text{EC}_{50}$  (7.1nM e 16.6nM) e rispettivamente una netta diminuzione ( $46.5 \pm 5.2\%$  rispetto al *wt*) e un uguale valore ( $93.8 \pm 3.8\%$ ) di  $\text{E}_{\text{max}}$ ; in maniera concorde con i dati di espressione in membrana.

Tutte le rimanenti varianti hanno invece un aumento di un ordine di grandezza nei valori di  $\text{EC}_{50}$  (42.9nM; 40.5nM; 65.6nM, 28.7nM rispettivamente per le varianti T260M, R268C, V274D e V331M), con un variabile decremento dei valori di  $\text{E}_{\text{max}}$ , meno marcato nel caso delle varianti T260M e V331 (rispettivamente  $82.1 \pm 2.9\%$  e  $78.6 \pm 1.1\%$ ) e più accentuato per le varianti R268C e V274D (rispettivamente  $67.8 \pm 4.1\%$  e  $40.3 \pm 5.8\%$ ).





Mutante	IP1	
	EC <sub>50</sub> (nM)	Emax (fold WT)
WT	3,4	1
V158I	3,4	89.5±14.0%
L173R	7,1	46.5±5.2%
T260M	42,9	82.1±2.9%
R268C	40,5	67.8±4.1%
V274D	65,6	40.3±5.8%
V331M	28,7	78.6±1.1%
V334M	16,6	93.8±3.8%

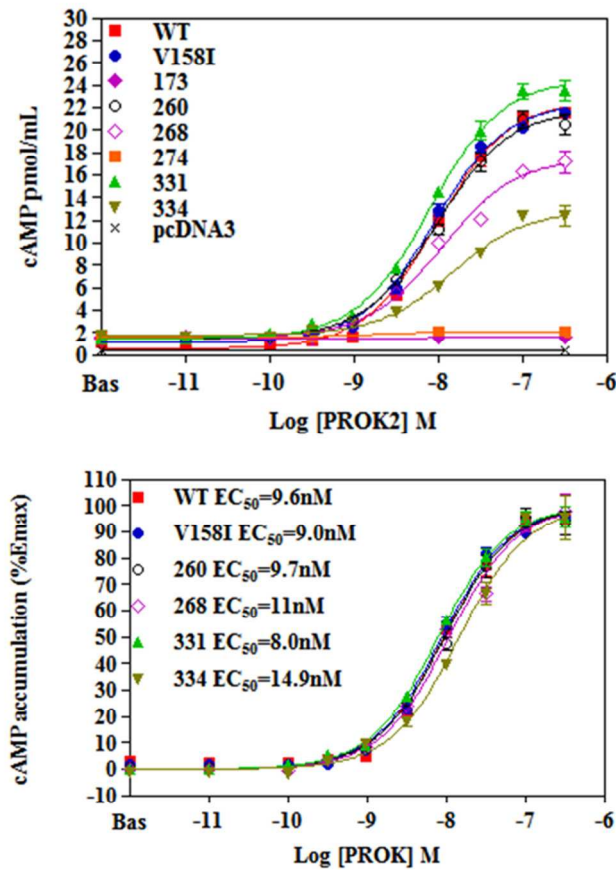
**Figura 21:** curva concentrazione-effetto del signaling IP3-IP1 mutanti nei costrutti di PROKR2. A) L'intensità della FRET misurata è espressa come rapporto della Emax del recettore *wild-type*. B) Valori espressi in % Emax di ciascuna curva concentrazione effetto. I valori di EC<sub>50</sub> sono stati calcolati mediante GraphPad Prism 5.0.

## CURVE CONCENTRAZIONE-EFFETTO PER cAMP

Dal momento che il recettore PROKR2 risulta accoppiato anche alla proteina G<sub>s</sub> (Chen et al., 2005), abbiamo voluto valutare, per la prima volta in letteratura, anche questa via di trasduzione del segnale. In questo caso, a dosi crescenti di ligando abbiamo dosato, come specificato nella sezione Materiali e Metodi, il conseguente accumulo di cAMP per il costrutto *wt* e per le varianti allo studio.

Anche in questo caso, i livelli basali di cAMP sono simili per tutte le varianti di PROKR2 analizzate. I nostri risultati, come evidenziato in figura 22, mostrano che le curve concentrazione-effetto di due varianti (V158I e T260M) sono indistinguibili dal recettore *wt*, sia in termini di Emax (rispettivamente 87.5±7.5% e 88.0±8.0% rispetto al *wild type*) che di EC<sub>50</sub> (rispettivamente 9.0nM e 9.7nM). La variante V331M è

caratterizzata da un aumento dell'Emax ( $124.5 \pm 16.5\%$  paragonata al *wt*), anche se ha dei livelli di espressione paragonabili a quelli del *wt* ( $89.5 \pm 5.3\%$ ), di contro non mostra nessuna variazione in termini di  $EC_{50}$  ( $8.0 \text{ nM}$  contro  $9.6 \text{ nM}$  del recettore *wt*). Le varianti R268C e V334M mostrano invece una diminuzione dell'Emax (rispettivamente  $83.0 \pm 6.0\%$  e  $73.5 \pm 14.5\%$  rispetto al *wt*), in parziale accordo con i ridotti livelli di espressione della variante R268C ( $62.1 \pm 4.8\%$ ) ed in contrasto con il marcato aumento di espressione della variante V334M ( $140.5 \pm 12.3\%$ ). I valori di  $EC_{50}$  per queste due varianti appaiono leggermente aumentate in confronto al recettore *wt* (rispettivamente  $11 \text{ nM}$  e  $14.9 \text{ nM}$ ). Infine le varianti L173 e V274 sono caratterizzate da una ridotta espressione (rispettivamente  $45.0 \pm 2.2\%$  e  $44.5 \pm 2.3\%$  rispetto al *wt*) e mostrano un blocco completo del signaling via cAMP, come visibile in maniera chiara dalla risposta assente anche a dosi elevate di Prokinetica 2.



Mutante	cAMP	
	$EC_{50}$ (nM)	Emax (fold WT)
WT	9,6	100%
V158I	9	$87.5 \pm 7.5\%$ e
L173R	0	$45.0 \pm 2.2\%$ e
T260M	9,7	$88.0 \pm 8.0\%$
R268C	11	$83.0 \pm 6.0\%$ e
V274D	0	$44.5 \pm 2.3\%$
V331M	8	$124.5 \pm 16.5\%$
V334M	14,9	$73.5 \pm 14.5\%$

**Figura 22:** curva concentrazione-effetto del signaling cAMP dei mutanti nei costrutti di PROKR2. A) Valori espressi in valore assoluto di Emax per ciascuna curva concentrazione effetto. B) L'intensità, misurata tramite saggio immunoradiativo, è espressa come rapporto della Emax rispetto al recettore *wild-type*. I valori di  $EC_{50}$  sono stati calcolati mediante GraphPad Prism 5.0.

## SAGGI FUNZIONALI: ESPRESSIONE, IP1 e cAMP.

L'insieme delle informazioni derivate dai diversi studi funzionali eseguiti, che tengono conto dei livelli di espressione dei diversi costrutti e la loro caratterizzazione farmacologica sia per la produzione di IP1 (via  $G_q$ ) che di cAMP (via  $G_s$ ) è riassunto in tabella 12.

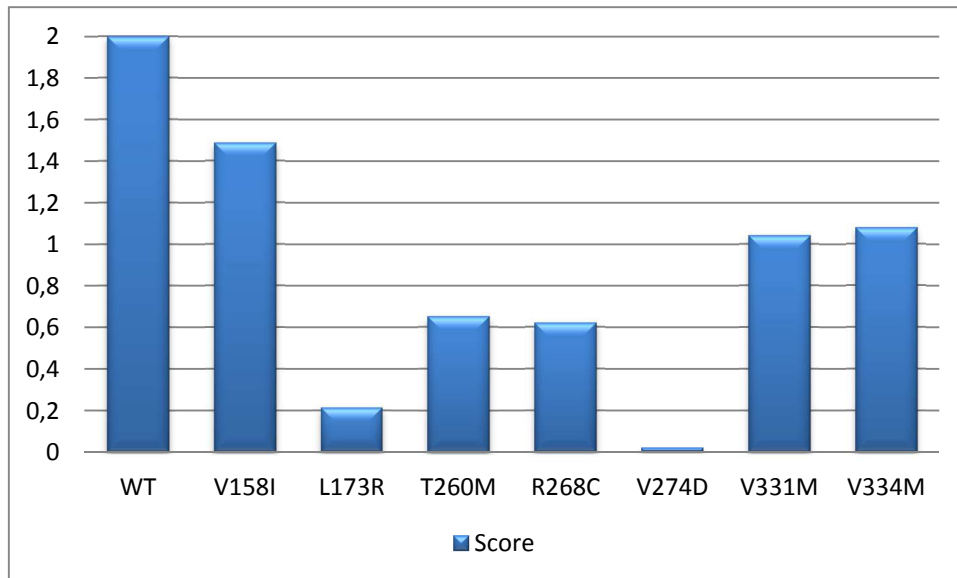
Mutazione	Espressione in membrana	IP1 (EC <sub>50</sub> )	cAMP (EC <sub>50</sub> )
V158I	70%	=	=
L173R	45%	=	no cAMP
T260M	60%	↑↑	=
R268C	65%	↑↑	=
V331M	80%	↑↑	=
V247D	45%	↑↑↑	no cAMP
V334M	125%	↑↑	↑↑

**Tabella 12:** dati riassuntivi vs wt di tutti gli studi funzionali effettuati con i mutanti di PROKR2.

I valori di EC<sub>50</sub> delle curve di concentrazione-effetto del wt nella via di produzione di cAMP e di IP1 sono risultati nel medesimo ordine di grandezza relativamente alla concentrazione di stimolo. Ciò ci suggerisce una pari importanza nell'attivazione delle due vie per questo recettore. Pertanto, partendo da questo presupposto, abbiamo creato, attraverso una formula matematica, uno score comprensivo delle diverse caratteristiche funzionali e di espressione delle nostre varianti (Figura 23). La visualizzazione grafica di questo score conferma il minore impatto funzionale della variante V158I (riduzione di circa 25% vs wt) e l'importante compromissione delle



caratteristiche farmacologiche della variante V274D (perdita di circa il 100% delle caratteristiche del wt, confermata dal netto aumento delle due  $EC_{50}$  e dalla ridotta espressione in membrana). I mutanti V331M e V334M mostrano invece una funzionalità pari a circa la metà di quella del wt; i mutanti T260M ed R268C a circa il 30% ed infine il mutante L173R che ha un'attività pari a circa il 10% del wt.



**Figura 23:** score funzionale delle diverse varianti di PROKR2.

**GENOTIPIZZAZIONE DI SNPs E CNVs IN  
PAZIENTI CON IPOGONADISMO CENTRALE  
IDIOPATICO. UN APPROCCIO ALTERANTIVO PER  
IDENTIFICARE NUOVI GENI CANDIDATI.**

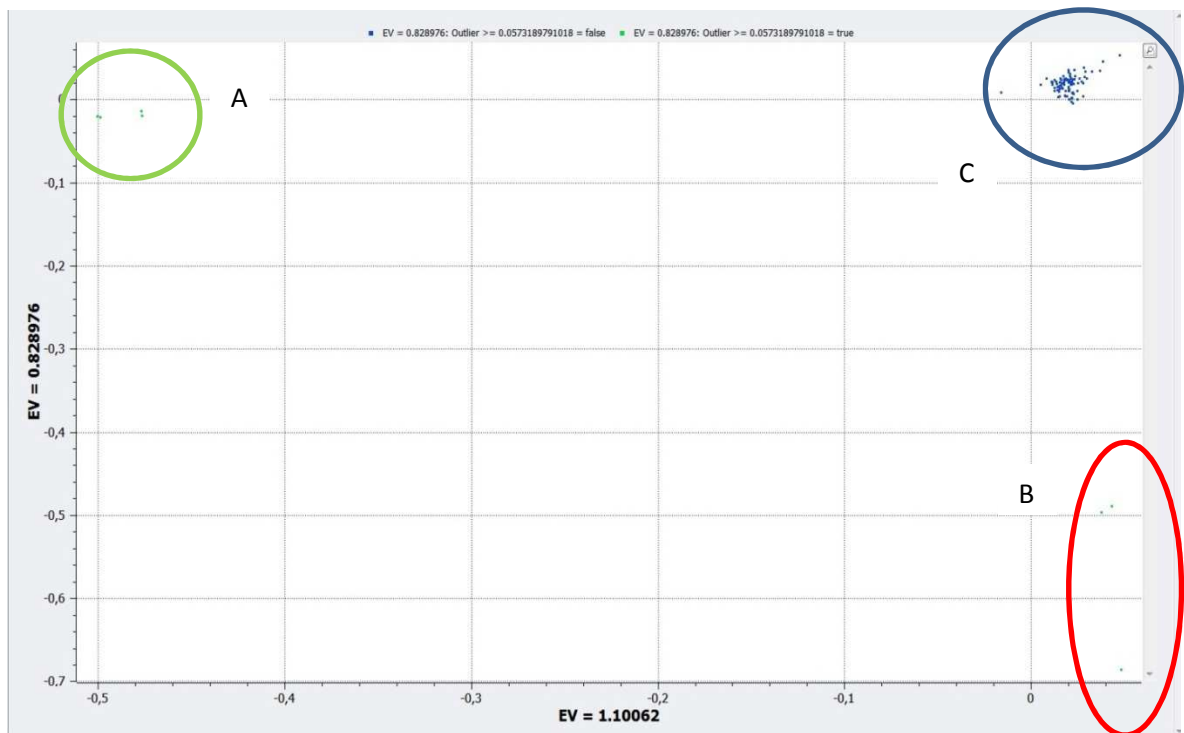
Nonostante ad oggi siano noti 14 geni implicati nella patogenesi di ICH, in circa il 65% dei pazienti non è ancora possibile identificare una causa genetica. Questo dato suggerisce come vi siano nuovi meccanismi ancora da identificare per la comprensione della patogenesi molecolare di questa patologia. In particolare possiamo ipotizzare nuovi geni coinvolti e ancora da identificare così come meccanismi alternativi quali microRNA, regolazioni epigenetiche nonché fattori ambientali. Al fine di identificare nuovi geni candidati coinvolti nell'ICH, abbiamo deciso di applicare, in pazienti selezionati, metodiche genetiche innovative quali il genotyping di SNP (Single Nucleotide Polymorphism), CNV (Copy Number Variants) ed LOH (Loss of heterozygosity od Homozygosity mapping).

La genotipizzazione di SNPs e CNVs è stato possibile grazie alla presenza nel nostro laboratorio di un grosso database di controlli sani (1864 campioni), che ci ha permesso di effettuare delle comparazioni caso/controllo che dessero un'indicazione delle zone da analizzare. L'analisi delle zone in perdita di eterozigotità (LOH) si è invece fondato sulla verifica dei blocchi aploipici che risultassero in perdita di eterozigotità nei probandi di una stessa famiglia, confrontandoli con quelli presenti nei familiari non affetti. Per questo tipo di studio è importante avere delle famiglie con almeno due probandi, o con un probando ed un parente con sintomi collegabili ad ICH (anosmia, palatoschisi, etc), in cui non ci sia una spiegazione genetica evidente.

## **ANALISI DEGLI SNPs**

### **ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI**

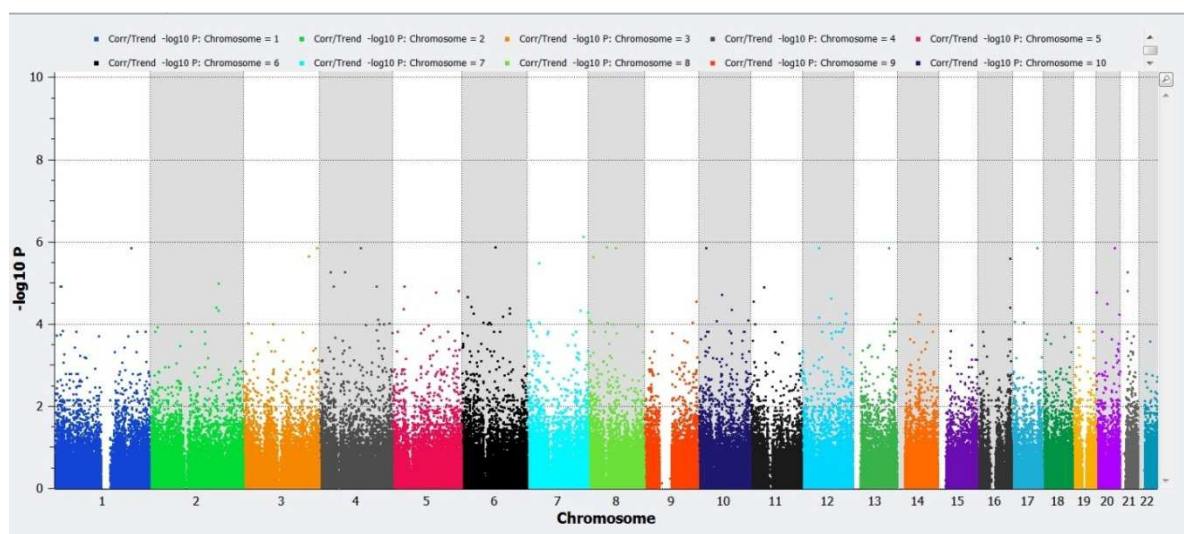
Questa analisi ha consentito di verificare che tutti i campioni analizzati (casi e controlli) fossero etnicamente omogenei. Dopo aver però analizzato matematicamente e graficamente (figura 24) le due componenti principali con la componente maggiore di varianza del modello, cioè PCA1 e PCA2, emerge un dato particolarmente interessante; infatti due delle famiglie di pazienti ICH analizzate mostrano un comportamento matematicamente differente dagli altri campioni. Nello specifico in entrambi i casi i pazienti ICH si collocano agli estremi del dot-plot, mentre i parenti sani degli stessi hanno un comportamento intermedio.



**Figura 24:** dot-plot PCA1 vs PCA2. A) Famiglia 1 ICH: 2 fratelli affetti, 2 fratelli sani. B) Famiglia 2 ICH: genitori consanguinei, 1 figlia affetta. C) 6 pazienti ICH, familiari e controlli fra la popolazione sana.

## TEST DI ASSOCIAZIONE SUL GENOTIPO

Per questo tipo di analisi si è utilizzato il programma Golden Helix Software®, effettuando un test di tipo caso/controllo dopo avere effettuato i controlli di qualità, come descritto nei materiali e metodi. I valori di significatività ottenuti graficamente sono riportati in figura 25:



**Figura 25:** Manhattan plot del test di associazione sul genotipo. Sull'asse delle X separati con colori differenti per cromosoma, sono riportati tutti gli SNPs; sull'Y i relativi *p-value* associati.

I dati ottenuti sono stati filtrati usando come valore soglia un  $p\text{-value} < 10^{-6}$  ed i *loci* identificati come statisticamente differenti fra casi e controlli sono stati riportati in tabella 13:

Gene/ miRNA	Cromosoma	Espressione	Funzione
GPR160	<a href="#">chr3:169755717-169803191</a>	Pressoché ubiquitaria, fatta eccezione per i tessuti nervosi e le cellule neuronali	<p><b>Molecular Function</b></p> <p>signal transducer activity (<a href="#">GO:0004871</a>)  receptor activity (<a href="#">GO:0004872</a>)  G-protein coupled receptor activity (<a href="#">GO:0004930</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b></p> <p>plasma membrane (<a href="#">GO:0005886</a>)  integral to membrane (<a href="#">GO:0016021</a>)</p>
SLC35A1	<a href="#">chr6:88180341-88222054</a>	Colon, cervello fetale, corteccia prefrontale, linfociti.	<p><b>Molecular Function</b></p> <p>nucleotide-sugar transmembrane transporter activity (<a href="#">GO:0005338</a>)  sugar:hydrogen symporter activity (<a href="#">GO:0005351</a>)  CMP-N-acetylneuraminate transmembrane transporter activity (<a href="#">GO:0005456</a>)</p> <p><b>Biological Process</b></p> <p>carbohydrate metabolic process (<a href="#">GO:0005975</a>)  protein modification process (<a href="#">GO:0006464</a>)  transport (<a href="#">GO:0006810</a>)  CMP-N-acetylneuraminate transport (<a href="#">GO:0015782</a>)  transmembrane transport (<a href="#">GO:0055085</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b></p> <p>Golgi membrane (<a href="#">GO:0000139</a>)  Golgi membrane (<a href="#">GO:0000139</a>)  Golgi apparatus (<a href="#">GO:0005794</a>)  integral to plasma membrane (<a href="#">GO:0005887</a>)  membrane (<a href="#">GO:0016020</a>)  integral to membrane (<a href="#">GO:0016021</a>)</p>
CNTNAP2	<a href="#">chr7:145813453-148118090</a>	Ghiandola pineale, cervello intero, corteccia prefrontale, lobo occipitale e parietale (meno espresso)	<p><b>Molecular Function</b></p> <p>receptor binding (<a href="#">GO:0005102</a>)  enzyme binding (<a href="#">GO:0019899</a>)</p> <p><b>Biological Process</b></p> <p>cell adhesion (<a href="#">GO:0007155</a>)  signal transduction (<a href="#">GO:0007165</a>)  brain development (<a href="#">GO:0007420</a>)  behavior (<a href="#">GO:0007610</a>)  neuron recognition (<a href="#">GO:0008038</a>)  transmission of nerve impulse (<a href="#">GO:0019226</a>)  striatum development (<a href="#">GO:0021756</a>)  limbic system development (<a href="#">GO:0021761</a>)  thalamus development (<a href="#">GO:0021794</a>)  cerebral cortex development (<a href="#">GO:0021987</a>)  neuron projection development (<a href="#">GO:0031175</a>)  cellular protein localization (<a href="#">GO:0034613</a>)  clustering of voltage-gated potassium channels (<a href="#">GO:0045163</a>)  superior temporal gyrus development (<a href="#">GO:0071109</a>)  protein localization to juxtaparanode region of axon (<a href="#">GO:0071205</a>)  vocalization behavior (<a href="#">GO:0071625</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b></p>

			<p>early endosome (<a href="#">GO:0005769</a>)  Golgi apparatus (<a href="#">GO:0005794</a>)  voltage-gated potassium channel complex (<a href="#">GO:0008076</a>)  cell surface (<a href="#">GO:0009986</a>)  membrane (<a href="#">GO:0016020</a>)  integral to membrane (<a href="#">GO:0016021</a>)  axon (<a href="#">GO:0030424</a>)  dendrite (<a href="#">GO:0030425</a>)  axolemma (<a href="#">GO:0030673</a>)  neuronal cell body (<a href="#">GO:0043025</a>)  perikaryon (<a href="#">GO:0043204</a>)  juxtaparanode region of axon (<a href="#">GO:0044224</a>)</p>
EYA1	<a href="#">chr8:72109668-72274467</a>	Ghiandola pineale	<p><b>Molecular Function</b>  protein tyrosine phosphatase activity (<a href="#">GO:0004725</a>)  hydrolase activity (<a href="#">GO:0016787</a>)  metal ion binding (<a href="#">GO:0046872</a>)</p> <p><b>Biological Process</b>  double-strand break repair (<a href="#">GO:0006302</a>)  regulation of transcription, DNA-dependent (<a href="#">GO:0006355</a>)  multicellular organismal development (<a href="#">GO:0007275</a>)  sensory perception of sound (<a href="#">GO:0007605</a>)  anatomical structure morphogenesis (<a href="#">GO:0009653</a>)  response to ionizing radiation (<a href="#">GO:0010212</a>)  chromatin modification (<a href="#">GO:0016568</a>)  histone dephosphorylation (<a href="#">GO:0016576</a>)  protein sumoylation (<a href="#">GO:0016925</a>)  peptidyl-tyrosine dephosphorylation (<a href="#">GO:0035335</a>)  positive regulation of DNA repair (<a href="#">GO:0045739</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b>  nucleus (<a href="#">GO:0005634</a>)  cytoplasm (<a href="#">GO:0005737</a>)</p>
PLXDC2	<a href="#">chr10:20105168-20569286</a>	Cellule mieloidi	<p><b>Cellular Component</b>  membrane (<a href="#">GO:0016020</a>)  integral to membrane (<a href="#">GO:0016021</a>)</p>
NELL2	<a href="#">chr12:44902058-45315631</a>	Cellule CD8+	<p><b>Molecular Function</b>  structural molecule activity (<a href="#">GO:0005198</a>)  structural molecule activity (<a href="#">GO:0005198</a>)  calcium ion binding (<a href="#">GO:0005509</a>)  calcium ion binding (<a href="#">GO:0005509</a>)  protein binding (<a href="#">GO:0005515</a>)</p> <p><b>Biological Process</b>  cell adhesion (<a href="#">GO:0007155</a>)  cell adhesion (<a href="#">GO:0007155</a>)  regulation of growth (<a href="#">GO:0040008</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b>  extracellular region (<a href="#">GO:0005576</a>)</p>
GPC5	<a href="#">chr13:92050929-93519490</a>	Pressoché ubiquitaria, con una maggiore espressione negli eritrociti e nelle cellule cardiache	<p><b>Molecular Function</b>  heparan sulfate proteoglycan binding (<a href="#">GO:0043395</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b>  extracellular region (<a href="#">GO:0005576</a>)  proteinaceous extracellular matrix (<a href="#">GO:0005578</a>)  extracellular space (<a href="#">GO:0005615</a>)  plasma membrane (<a href="#">GO:0005886</a>)  integral to plasma membrane (<a href="#">GO:0005887</a>)  anchored to membrane (<a href="#">GO:0031225</a>)</p>

<b>ZDHHC7</b>	<a href="#">chr16:85007787-85045141</a>	Polmoni e leucociti	<p><b>Molecular Function</b></p> <p>zinc ion binding (<a href="#">GO:0008270</a>)  transferase activity, transferring acyl groups (<a href="#">GO:0016746</a>)  metal ion binding (<a href="#">GO:0046872</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b></p> <p>membrane (<a href="#">GO:0016020</a>)  integral to membrane (<a href="#">GO:0016021</a>)</p>
<b>CACNG4</b>	<a href="#">chr17:64961013-65029518</a>	Pressoché ubiquitaria con una maggiore espressione nel peduncolo cerebrale	<p><b>Molecular Function</b></p> <p>voltage-gated ion channel activity (<a href="#">GO:0005244</a>)  voltage-gated calcium channel activity (<a href="#">GO:0005245</a>)</p> <p><b>Biological Process</b></p> <p>transport (<a href="#">GO:0006810</a>)  ion transport (<a href="#">GO:0006811</a>)  synaptic transmission (<a href="#">GO:0007268</a>)  membrane depolarization (<a href="#">GO:0051899</a>)  regulation of calcium ion transport via voltage-gated calcium channel activity (<a href="#">GO:0051925</a>)  regulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate selective glutamate receptor activity (<a href="#">GO:2000311</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b></p> <p>plasma membrane (<a href="#">GO:0005886</a>)  integral to plasma membrane (<a href="#">GO:0005887</a>)  endocytic vesicle membrane (<a href="#">GO:0030666</a>)  alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid selective glutamate receptor complex (<a href="#">GO:0032281</a>)</p>
<b>CSE1L</b>	<a href="#">chr20:47662838-47713489</a>	Testicoli, adenocarcinoma colonrettale, cellule epiteliali bronchiali, leucemie, precursori eritroidi, linfoblasti	<p><b>Molecular Function</b></p> <p>protein binding (<a href="#">GO:0005515</a>)  importin-alpha export receptor activity (<a href="#">GO:0008262</a>)  protein transporter activity (<a href="#">GO:0008565</a>)</p> <p><b>Biological Process</b></p> <p>intracellular protein transport (<a href="#">GO:0006886</a>)  apoptosis (<a href="#">GO:0006915</a>)  cell proliferation (<a href="#">GO:0008283</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b></p> <p>nucleus (<a href="#">GO:0005634</a>)  cytoplasm (<a href="#">GO:0005737</a>)</p>
<b>STAU1</b>	<a href="#">chr20:47729878-47804904</a>	Pressoché ubiquitaria, ma con un'aumentata espressione nei tessuti di tipo endocrino	<p><b>Molecular Function</b></p> <p>double-stranded RNA binding (<a href="#">GO:0003725</a>)  protein binding (<a href="#">GO:0005515</a>)</p> <p><b>Biological Process</b></p> <p>intracellular mRNA localization (<a href="#">GO:0008298</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b></p> <p>intracellular (<a href="#">GO:0005622</a>)  cytoplasm (<a href="#">GO:0005737</a>)  rough endoplasmic reticulum (<a href="#">GO:0005791</a>)  microtubule associated complex (<a href="#">GO:0005875</a>)  cytoplasmic stress granule (<a href="#">GO:0010494</a>)  ribonucleoprotein complex (<a href="#">GO:0030529</a>)</p>
<b>mir4275</b>	<a href="#">4: 28821204-28821290 [+]</a>	Nessuna informazione	Nessuna informazione
<b>mir507/508/509</b>	<a href="#">X: 146312238-146312361 [-]</a>	Testicoli	Nessuna informazione

**Tabella 13:** Informazioni biologico-molecolari dei *loci* identificati con l'analisi degli SNPs.

Analizzando le informazioni sulla funzione biologica e sull'espressione dei 13 target genetici identificati, la maggior parte di essi sembrano essere dei falsi positivi, in maniera concorde con quanto atteso dall'analisi del Q-Q plot (vedi materiali e metodi). Nello specifico, geni quali GPR160, EYA1, PLXDC2, NELL2, ZDHHC7, CACNG4, CSE1L, SLC35A1 e STAU1, non hanno un'espressione concorde con le zone in cui avvengono i processi di ontogenesi, migrazione e secrezione dei neuroni GnRH secernenti (epitelio olfattorio, zona subventricolare ed ipotalamo).

Un candidato interessante è il gene CNTNAP2, che ha un'espressione parzialmente sovrapponibile alle aree di sviluppo ed azione dei neuroni GnRH secernenti ed ha un ruolo nello sviluppo della zona talamica e più in generale nello sviluppo del cervello durante il periodo embrionale. L'assenza ad oggi di un modello animale in cui sia stato geneticamente spento questo gene non ci rende possibile sapere se l'assenza di questo gene si associ, in vivo, a ipogonadismo centrale. Tuttavia, analisi di *linkage* su famiglie di pazienti con autismo hanno evidenziato che varianti a carico di questo gene correlano con un'aumentata suscettibilità per questa patologia. (Alarcon et al., 2008)

Un altro candidato interessante è il gene GPC5, un gene con un'espressione praticamente ubiquitaria che ad oggi è stato visto essere coinvolto in tumori quali linfomi follicolari, delle cellule B ed in carcinomi polmonari di tipo *small cell* e *non-small*. (Mao et al., 2002) . La proteina per cui questo gene codifica, proteina denominata *gpc*, lega gli HPSG sia nel cervello del feto, che, in misura minore, in quello dell'adulto. (Veugelers et al., 1997) Questo dato risulta particolarmente interessante alla luce di un recente lavoro (Tornberg et al., 2011) in cui si dimostra che il gene Heparan-sulphate 6-sulphotransferase 1(HS6ST1), coinvolto nei processi di modificazione degli eparan-solfati, rappresenta una nuova causa genetica di ICH. Pertanto si potrebbe ipotizzare che GPC5 svolga un ruolo analogo in questo pathway e che quindi possa essere implicato nella patogenesi genetica di ICH. Inoltre GPC5 si trova in un cluster genomico in cui è presente anche il gene HS6ST3 che ha un'elevata omologia di sequenza con l'HS6ST1 e probabilmente un ruolo biologico simile. Purtroppo come nel caso precedente non esistono ad oggi modelli murini in grado di validare in vivo queste osservazioni.

Infine bisogna evidenziare come vengano identificati due clusters di microRNA (mir4275 e mir507/508/509), che potrebbero indicare un possibile meccanismo patogenetico alternativo per l'ICH ad oggi non ancora analizzato.



## ANALISI DEI CNVs

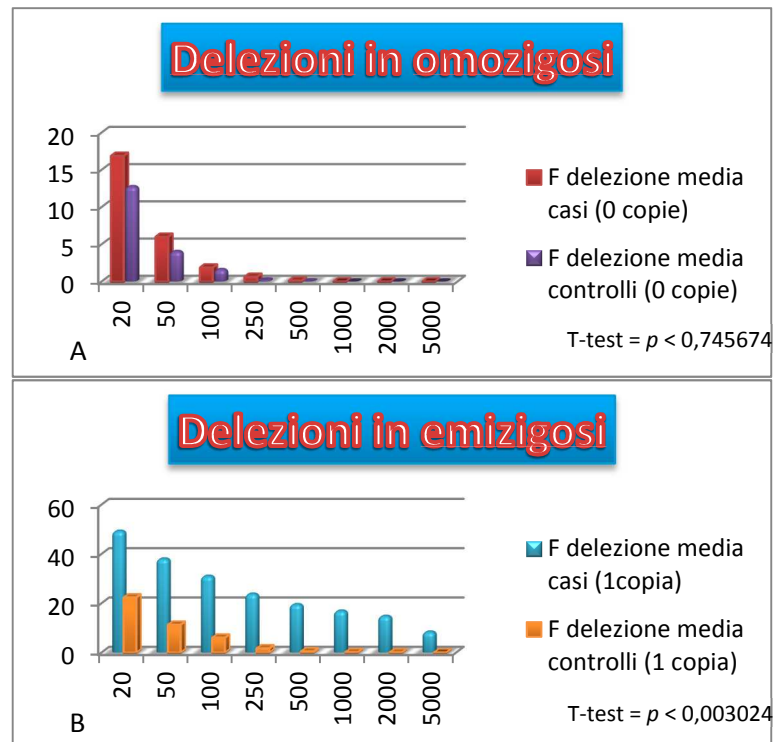
L'analisi delle Copy Number Variants relativa all'ICH è stata divisa in due parti: nella prima è stata fatta una valutazione generale della frequenza di delezione fra i due gruppi (caso *vs.* controllo), nella seconda parte si è andato a verificare quali specifici CNVs fossero presenti in maniera differente fra i due gruppi.

## ANALISI GLOBALE DEI CNVs

Utilizzando il programma pLINK è stato fatto un calcolo sulle due differenti popolazioni per identificare e confrontare il numero di delezioni in duplice copia o in copia singola. L'analisi è stata fatta considerando delezioni di diversa dimensione, partendo da una soglia minima di 20 kilobasi fino a quella massima di 5 megabasi. I dati ottenuti sono riportati nella tabella 14.

Ampiezza delezioni (Kb)	Del omozigosi/casi	Del omozigosi/controlli	Del emizigosi/casi	Del emizigosi/controlli
20	16,875	12,72479	49,125	22,33959
50	6	4,01985	37,875	11,26878
100	1,875	1,591738	30,875	6,027361
250	0,625	0,219957	23,625	1,697425
500	0,125	0,028433	19,375	0,434549
1000	0	0,00912	16,75	0,111588
2000	0	0,003219	14,625	0,04721
5000	0	0,001073	8,25	0,021459

**Tabella 14:** Frequenza media di delezione in omozigosi ed emizigosi fra casi ICH e controlli.



**Figura 26:** frequenze medie di delezione in casi e controlli; A) in omozigosi (0 copie) B) in emizigosi (1 copia). Il numero totale di delezioni è stato normalizzato per il numero dei pazienti (n = 8) ed il numero dei controlli (n = 1864).

Effettuando un test esatto di Fisher la differenza fra i due gruppi risulta statisticamente significativa nel caso delle delezioni in singola copia, mentre per quanto riguarda le delezioni in omozigosi la differenza è non significativa. Quindi si osserva che a livello globale i pazienti ICH presentano comunque un numero di delezioni maggiore rispetto alla popolazione di controllo.

### ANALISI LOCUS-SPECIFICA DEI CNVs

Dopo aver analizzato globalmente le variazioni del numero di copie, si è deciso di effettuare un'analisi caso controllo nella quale sono stati selezionati tutti quei loci che presentavano una delezione in almeno 2 pazienti ICH ed in nessuno dei 1864 controlli. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 15.

Gene/miRNA	Cromosoma	Espressione	Funzione
EFHC2	<a href="#">chrX:44007128-44202923</a>	Ubiquitaria, maggiormente espresso nella corteccia surrenalica e nei cardiomiciti	<b>Molecular Function</b> calcium ion binding (GO:0005509)
VBP1	<a href="#">chrX:154425284-154468098</a>	Leucociti, eritrociti, ipotalamo e amigdala.	<b>Molecular Function</b> unfolded protein binding (GO:0051082) <b>Biological Process</b> protein folding (GO:0006457) cellular protein metabolic process (GO:0044267) 'de novo' posttranslational

			<p>protein folding (<a href="#">GO:0051084</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b></p> <p>nucleus (<a href="#">GO:0005634</a>)</p> <p>cytoplasm (<a href="#">GO:0005737</a>)</p> <p>prefoldin complex (<a href="#">GO:0016272</a>)</p> <p>intracellular membrane-bounded organelle (<a href="#">GO:0043231</a>)</p>
<b>RAB39B</b>	<a href="#">chrX:154487526-154493874</a>	Linforma di Burkitt, polmoni e cervello	<p><b>Molecular Function</b></p> <p>nucleotide binding (<a href="#">GO:0000166</a>)</p> <p>GTP binding (<a href="#">GO:0005525</a>)</p> <p><b>Biological Process</b></p> <p>small GTPase mediated signal transduction (<a href="#">GO:0007264</a>)</p> <p>protein transport (<a href="#">GO:0015031</a>)</p> <p>vesicle-mediated transport (<a href="#">GO:0016192</a>)</p> <p>synapse organization (<a href="#">GO:0050808</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b></p> <p>intracellular (<a href="#">GO:0005622</a>)</p> <p>cytoplasm (<a href="#">GO:0005737</a>)</p> <p>Golgi apparatus (<a href="#">GO:0005794</a>)</p> <p>plasma membrane (<a href="#">GO:0005886</a>)</p>
<b>CLIC2</b>	<a href="#">chrX:154505500-154563966</a>	Eritrociti, tiroide, leucemia	<p><b>Molecular Function</b></p> <p>voltage-gated ion channel activity (<a href="#">GO:0005244</a>)</p> <p>voltage-gated chloride channel activity (<a href="#">GO:0005247</a>)</p> <p>chloride channel activity (<a href="#">GO:0005254</a>)</p> <p><b>Biological Process</b></p> <p>transport (<a href="#">GO:0006810</a>)</p> <p>ion transport (<a href="#">GO:0006811</a>)</p> <p>chloride transport (<a href="#">GO:0006821</a>)</p> <p>signal transduction (<a href="#">GO:0007165</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b></p> <p>intracellular (<a href="#">GO:0005622</a>)</p> <p>nucleus (<a href="#">GO:0005634</a>)</p> <p>cytoplasm (<a href="#">GO:0005737</a>)</p> <p>membrane (<a href="#">GO:0016020</a>)</p> <p>integral to membrane (<a href="#">GO:0016021</a>)</p> <p>chloride channel complex (<a href="#">GO:0034707</a>)</p>
<b>F8A</b>	<a href="#">chrX:154114635-154116335</a>	Polmoni, tiroide, eritrociti, fegato, cuore, cervello, linfociti	Nessuna informazione
<b>MBL1P1</b>	<a href="#">Chr10: 81,664,654-81,710,092</a>	Cellule staminali mesenchimali, epididimo, fegato, paratiroidi	Nessuna informazione
<b>SFTPD</b>	<a href="#">chr10:81697496-81742370</a>	Polmoni	<p><b>Molecular Function</b></p> <p>protein binding (<a href="#">GO:0005515</a>)</p> <p>sugar binding (<a href="#">GO:0005529</a>)</p> <p>bacterial cell surface binding (<a href="#">GO:0051635</a>)</p> <p><b>Biological Process</b></p> <p>regulation of cytokine production (<a href="#">GO:0001817</a>)</p> <p>receptor-mediated endocytosis (<a href="#">GO:0006898</a>)</p> <p>respiratory gaseous exchange (<a href="#">GO:0007585</a>)</p> <p>cell junction assembly (<a href="#">GO:0034329</a>)</p>

			<p>negative regulation of T cell proliferation (<a href="#">GO:0042130</a>)  surfactant homeostasis (<a href="#">GO:0043129</a>)  negative regulation of interleukin-2 biosynthetic process (<a href="#">GO:0045085</a>)  innate immune response (<a href="#">GO:0045087</a>)  macrophage chemotaxis (<a href="#">GO:0048246</a>)  lung alveolus development (<a href="#">GO:0048286</a>)  positive regulation of phagocytosis (<a href="#">GO:0050766</a>)  reactive oxygen species metabolic process (<a href="#">GO:0072593</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b></p> <p>extracellular region (<a href="#">GO:0005576</a>)  collagen (<a href="#">GO:0005581</a>)  extracellular space (<a href="#">GO:0005615</a>)  lysosome (<a href="#">GO:0005764</a>)  endocytic vesicle (<a href="#">GO:0030139</a>)</p>
<b>FAM86B1</b>	<a href="#">chr8:12035972-12052469</a>	Rene e muscolo scheletrico	Nessuna informazione
<b>FAM66A</b>	<a href="#">Chr8: 12,219,527-12,268,510</a>	Nessun dato	Nessuna informazione
<b>BC042086</b>	<a href="#">chrX:154229646-154257017</a>	Nessun dato	Nessuna informazione
<b>ZNF705D</b>	<a href="#">chr8:11961898-11973025</a>	Nessun dato	<p><b>Molecular Function</b></p> <p>DNA binding (<a href="#">GO:0003677</a>)  zinc ion binding (<a href="#">GO:0008270</a>)  metal ion binding (<a href="#">GO:0046872</a>)</p> <p><b>Biological Process</b></p> <p>regulation of transcription, DNA-dependent (<a href="#">GO:0006355</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b></p> <p>intracellular (<a href="#">GO:0005622</a>)  nucleus (<a href="#">GO:0005634</a>)</p>
<b>ZNF704</b>	<a href="#">chr8:81540686-81787016</a>	Ubiquitario	<p><b>Molecular Function</b></p> <p>zinc ion binding (<a href="#">GO:0008270</a>)  metal ion binding (<a href="#">GO:0046872</a>)</p> <p><b>Cellular Component</b></p> <p>intracellular (<a href="#">GO:0005622</a>)</p>
<b>VLDLR</b>	<a href="#">chr9:2621834-2654480</a>	Isole pancreatiche, cellule epiteliali bronchiali, retina, tiroide	<p><b>Molecular Function</b></p> <p>receptor activity (<a href="#">GO:0004872</a>)  low-density lipoprotein receptor activity (<a href="#">GO:0005041</a>)  calcium ion binding (<a href="#">GO:0005509</a>)  protein binding (<a href="#">GO:0005515</a>)  very-low-density lipoprotein particle receptor activity (<a href="#">GO:0030229</a>)  apolipoprotein binding (<a href="#">GO:0034185</a>)</p> <p><b>Biological Process</b></p> <p>transport (<a href="#">GO:0006810</a>)  lipid transport (<a href="#">GO:0006869</a>)  endocytosis (<a href="#">GO:0006897</a>)  signal transduction (<a href="#">GO:0007165</a>)  nervous system development (<a href="#">GO:0007399</a>)  heart development (<a href="#">GO:0007507</a>)  response to nutrient (<a href="#">GO:0007584</a>)  memory (<a href="#">GO:0007613</a>)</p>

			steroid metabolic process (GO:0008202) cholesterol metabolic process (GO:0008203) response to hormone stimulus (GO:0009725) ventral spinal cord development (GO:0021517) cerebral cortex development (GO:0021987) cellular response to insulin stimulus (GO:0032869) very-low-density lipoprotein particle clearance (GO:0034447) cellular response to glucose starvation (GO:0042149) response to drug (GO:0042493) cellular response to lipopolysaccharide (GO:0071222) cellular response to interleukin- 1 (GO:0071347) cellular response to hypoxia (GO:0071456) <b>Cellular Component</b> extracellular space (GO:0005615) membrane fraction (GO:0005624) nucleus (GO:0005634) plasma membrane (GO:0005886) coated pit (GO:0005905) cell surface (GO:0009986) membrane (GO:0016020) integral to membrane (GO:0016021) very-low-density lipoprotein particle (GO:0034361) apical part of cell (GO:0045177) perinuclear region of cytoplasm (GO:0048471)
PPFIA2	<a href="#">chr12:81652045-82153332</a>	Ghiandola pineale	<b>Molecular Function</b> protein binding (GO:0005515) <b>Biological Process</b> cell-matrix adhesion (GO:0007160) <b>Cellular Component</b> cytoplasm (GO:0005737) cell surface (GO:0009986)
HDGF2	<a href="#">chr19:4472255-4502213</a>	Cervello, testicoli, polmoni, prostata, tiroide	<b>Molecular Function</b> DNA binding (GO:0003677) <b>Biological Process</b> transcription, DNA-dependent (GO:0006351) <b>Cellular Component</b> nucleus (GO:0005634)
LOC646214	<a href="#">Chr3: 196,466,728-196,559,518</a>	Ubiquitaria	Nessuna informazione
mir320D2	<a href="#">ChrX: 140008337-140008384 [-]</a>	Nessun dato	Nessuna informazione

**Tabella 15:** Informazioni biologico-molecolari dei *loci* identificati con l'analisi dei CNVs.

Valutando i risultati ottenuti da questa analisi emerge come ci sia un forte sbilanciamento verso geni presenti sul cromosoma X. Ciò è dovuto alla distorsione introdotta dai cromosomi sessuali in quanto il cromosoma X essendo presente in una

sola copia nei maschi aumenterà la possibilità di verificare delezioni complete di un gene durante l'analisi caso/controllo. Valutando nello specifico i *loci* identificati si può osservare come la maggior parte di essi sia a funzione (e spesso ad espressione) sconosciuta, come ad esempio EFHC2, CLIC2, FAM86B1, FAM66A, BC042086, ZNF705D, ZNF704, HDGF2 e LOC646214.

I candidati più interessanti sembrano essere RAB39B, un gene che codifica per una proteina coinvolta nei processi di *trafficking* intracellulare, fortemente espressa a livello del sistema nervoso. Questo gene è associato a ritardo mentale e la sua down-regolazione porta a una riduzione nel numero di neuriti (Giannandrea et al., 2010). Il gene PPFAI2, invece, codifica per un recettore tirosin-chinasico implicato nei processi di *axon guidance* (Serra-Pages et al., 1998).

## ANALISI DELLE REGIONI LOH

Infine è stata effettuata un'analisi di tipo familiare volta ad identificare geni localizzati in zone a perdita di eterozigosità in pazienti ICH e non presenti in familiari non affetti. Questo tipo di indagine permette di individuare dei geni che presentino una ereditarietà genetica di tipo autosomico recessivo. Questo approccio richiede pedigree familiari selezionati in cui ci sia la presenza di più pazienti affetti e il maggior numero possibile di familiari sani.

L'analisi delle regioni in perdita di eterozigosità viene anche detta analisi di autozigosità ed è già stata applicata con successo nel campo dell'ipogonadismo centrale idiopatico dal gruppo di Topaloglu nel 2009, portando alla scoperta della Neurokinina-3 (TAC3) e del suo recettore (TAC3R) come geni correlati a questa patologia. (Topaloglu et al., 2009)

I geni identificati sono riportati nella tabella sottostante:

Geni in zone LOH			
ANKRD36	GPR17	NPS	RAB23
ANUBL1	GTF2B	NTNG1	RAB5C
ASCC3	HCN1	OFCC1	RABEPK
ATRX	HEXA	OFD1	RAGE
CHCHD8	HS6ST2	OPRK1	RB1CC1
CTNNA3	INA	PCDH15	RC3H1
DNAJC9	KHDRBS2	PCDH17	ROD1
DOCK1	KIF3C	PIK3C3	RXFP2
FGF10	MID1	PKN2	RYR2
FGF7	MIR384	PLXNA4	SHCBP1
FGFR2	NAALAD2	PLXNB3	SOAT1
GABRA3	NCAM2	PLXNC1	SORCS1
GABRB3	NDNL2	PLXND1	SUSD1
GNRHR	NPBWR1	PPARGC1A	TRIM27
GPHN	NPHS2	PTPRD	VMA2

Legenda

FGFR pathway
GNRHR pathway
Difetti della linea mediana
Differenziamento del CNS e dell'ipotalamo
Sviluppo dei bulbi olfattori
Plexine
RAB

**Tabella 16:** geni candidati identificati nelle analisi delle zone LOH. In evidenza sono riportati i candidati di maggior interesse per l'ICH, con i relativi pathway di riferimento in legenda.

Data l'elevato numero di geni è stato deciso di utilizzare un approccio globale di analisi, volto ad identificare degli arricchimenti per determinate famiglie di proteine. Questo è stato fatto utilizzando software di *gene ontology*, in grado di classificare ogni singolo gene e di individuare dei cluster genetico-funzionali comuni. E' stata poi fatta anche una valutazione gene-specifica, analogamente a quanto effettuato per SNPs e CNVs, i cui dati non vengono qui riportati per la loro estrema numerosità. Utilizzando il software DAVID si è visto che la maggior parte dei geni identificati codificano per proteine di membrana o transmembrana, molte delle quali sono dei recettori coinvolti nel signaling cellula-cellula o nell'interazione ligando-recettore dei peptidi neuroattivi.





**Figura 27:** grafico dei pathway maggiormente rappresentati dai geni identificati nell'analisi LOH. (<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>)

Analizzando nello specifico l'espressione e il ruolo biologico dei geni identificati nell'analisi delle zone in perdita di eterozigotità, come nel caso relativo agli SNPs e i CNVs, si può osservare che la maggior parte dei geni sono a funzione sconosciuta (ANKRD36, ANUBL1, ASCC3, CHCHD8, DNAJC9, GABRA3, KIF3C, NPBWR1, RB1CC1, RC3H1, ROD1); mentre altri geni hanno delle funzioni note che però non sembrano coincidere con un eventuale coinvolgimento nell'eziopatogenesi dell'ICH (ATRX, CTNNA3, GPHN, GPR17, GTF2B, HCN1, HEXA, KHDRBS2, NPHS2, OPRK1, PCDH15, PKN2, PLXNC1, PPARGC1A, RABEPK, RAGE, RYR2, SHCBP1, SOAT1, SORCS1, SUSU1, TRIM27, VMA2). Dei rimanenti geni molti sono interessanti per il loro ruolo o per l'associazione con dei sintomi caratteristici dell'ICH quali la labiopalatoschisi (GABRB3, MID1, OFCC1, OFD1), alterazioni dei bulbi olfattori (DOCK1, NCAM2, PCDH17), il criptorchidismo (RXFP2).

Inoltre viene riconfermato il coinvolgimento di pathway già noti per essere coinvolti nell'eziopatogenesi dell'ICH: 1) FGFR pathway: FGFR2, FGF7, FGF10. 2) GnRH pathway: GNRHR. 3) Plexine: PLXNA4, PLXNB3, PLXNC1, PLXND1. 4) HPSG pathway: HS6ST2.

Altri geni di interesse:

Gene	Cromosoma	Espressione	Funzione	Citazione
<b>INA</b>	<a href="#">chr10:105036920-105050108</a>	CNS e ipofisi	Differenziamento ipofisi	
<b>NAALAD2</b>	<a href="#">chr11:89864683-89926062</a>	Ipofisi	Differenziamento ipofisi	
<b>NDNL2</b>	<a href="#">chr15:29560353-29562033</a>	Ubiquitaria	Implicato nella sindrome di Angelmann e nella sindrome di Prader-Willi	(Chibuk et al., 2001)
<b>NPS</b>	<a href="#">chr10:129347613-129350935</a>	CNS	Correlato con gli stati di ansia, iperattività e ipersessualità.	(Mochizuki et al., 2010)
<b>NTNG1</b>	<a href="#">chr1:107682629-108026080</a>	Ubiquitaria, con una maggiore espressione nell'utero	Sviluppo del CNS, dell'ipotalamo e nell' <i>axon guidance</i>	(Lin et al., 2003)
<b>PIK3C3</b>	<a href="#">chr18:39535171-39667794</a>	Ubiquitaria, maggiore	Via di trasduzione del	(Volinia et al., 1995)

		espressione nella muscolatura liscia e nei linfociti.	segnale IP3-IP1 e sistema di vescicolazione.	
<b>PTPRD</b>	<a href="#">chr9:8314246-10612723</a>	CNS e cervello fetale	Recettore coinvolto nei processi di <i>axon guidance</i> , differenziamento neuronale e proliferazione.	(Uetani et al., 2000)
<b>RAB23</b>	<a href="#">chr6:57053581-57087078</a>	Ubiquitaria, maggiormente espresso nell'utero	Sviluppo del tubo neurale e coinvolgimento nel pathway di Sonic Hedgehog, sindrome di Carpenter.	(Gunther et al., 1994)
<b>RAB5C</b>	<a href="#">chr17:40276994-40307035</a>	Ubiquitaria	Sistema di internalizzazione dei recettori di membrana (FGFR1)	(Bryant and Stow, 2005; Bryant et al., 2005)

**Tabella 17:** Informazioni biologico-molecolari dei *loci* identificati con l'analisi delle zone LOH.

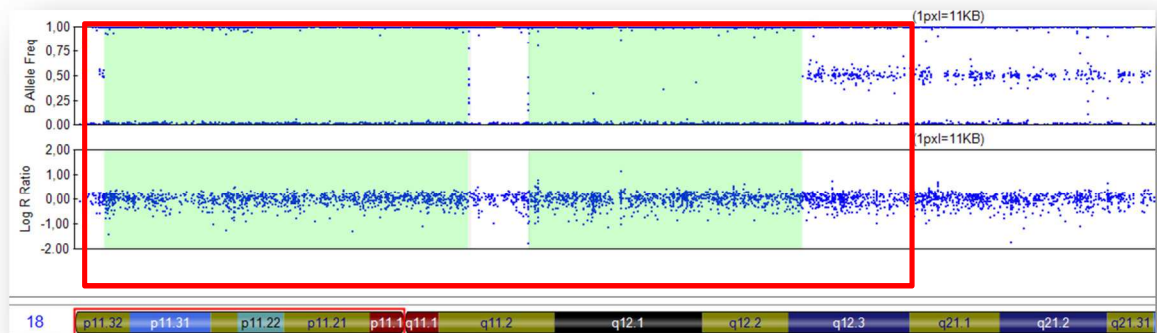
Analogamente a quanto rilevato nelle altre due analisi (CNVs e SNPs), anche nel caso dell'LOH è stato identificato un microRNA in una delle zone di interesse (mir-384), anche se dall'unica pubblicazione in letteratura, esso pare essere un microRNA regolatore specifico del pancreas. (Poy et al., 2004)

## ALTERAZIONI CARIOTIPICHE

Dopo aver fatto delle valutazioni sui singoli *loci*, è stata effettuata un'analisi volta ad identificare alterazioni cariotipiche nei nostri pazienti ICH. Analisi citogenetiche precedenti avevano escluso la presenza di cariotipi 45 X0, 47 XXY.

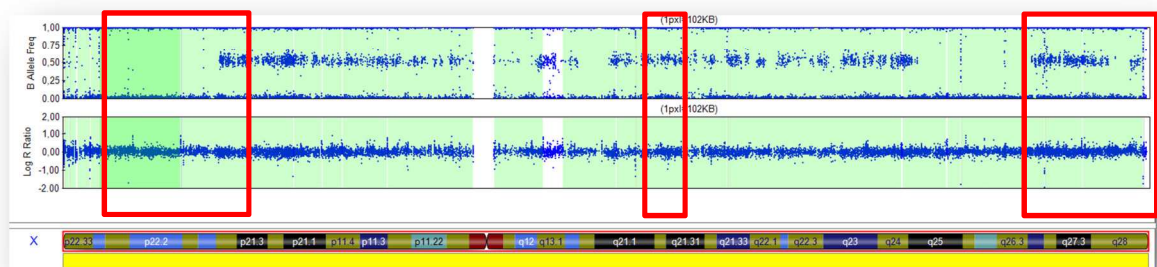
Andando però a valutare nel dettaglio le intensità di fluorescenza delle sonde (LogR ratio) e la frequenza biallelica (B Freq), è possibile ricostruire una rappresentazione dettagliata dell'intero pannello cromosomico, analogamente a quanto avviene negli array CGH.

Una paziente con nICH, figlia di genitori consanguinei, presenta una perdita di eterozigotà completa su una grossa porzione del braccio *p* del cromosoma 18.



**Figura 28:** perdita di eterozigotà nel cromosoma 18p di una paziente nIHH.

Nelle altre analisi di tipo familiare è stata identificata un'altra macroscopica alterazione sul cromosoma X della madre di uno dei pazienti. Questo dato risulta particolarmente interessante data la presenza del gene KAL-1, uno dei geni maggiormente coinvolti in KS, e l'unico delle forme X-linked, che mappa sul cromosoma X. In figura 29 è riportata la visualizzazione delle zone LOH relative a questo caso.

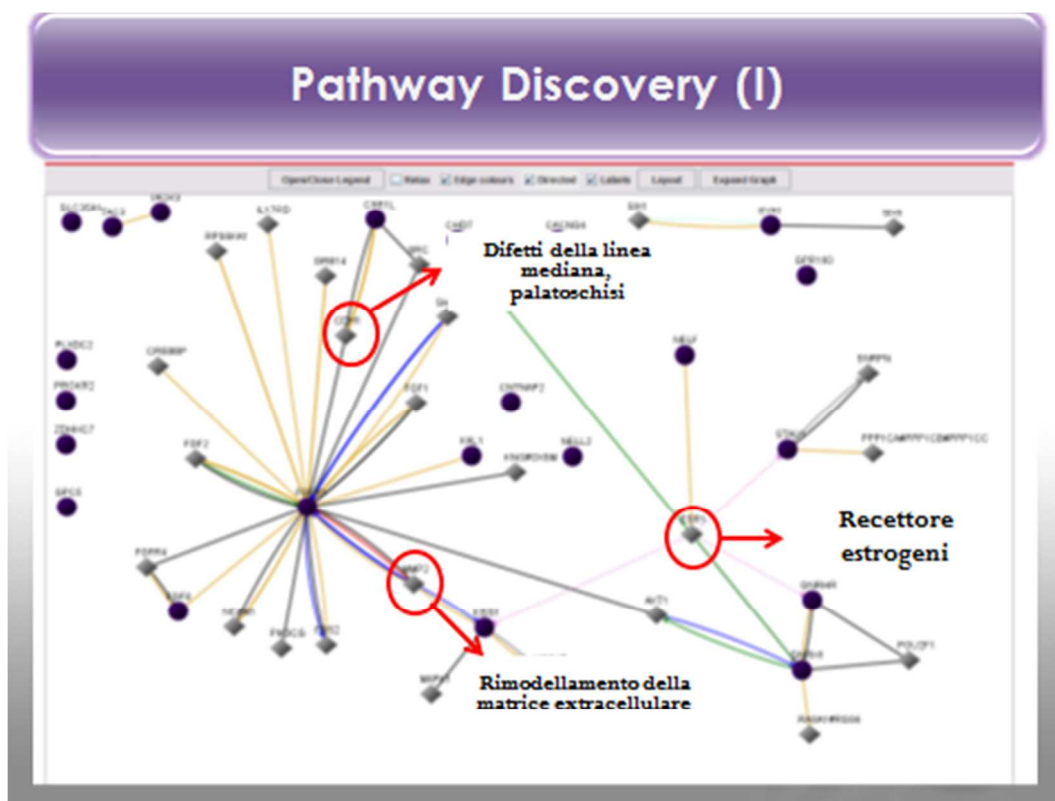


**Figura 29:** cromosoma X della madre di un paziente maschio con nIHH. Si evidenziano due grosse zone in perdita di eterozigotà ed una di dimensioni minori. Nella prima è presente il gene KAL1, che però non risulta essere mutato a seguito di sequenziamento diretto.

## PATHWAY DISCOVERY

Al fine di valutare i dati ottenuti, evidenziando graficamente gli arricchimenti per determinati pathway, ma anche di evidenziare degli interattori comuni ai geni identificarli, o per ricavarli indirettamente, abbiamo utilizzato il programma GNC Pro (<http://gncpro.sabiosciences.com/gncpro/gncpro.php>).

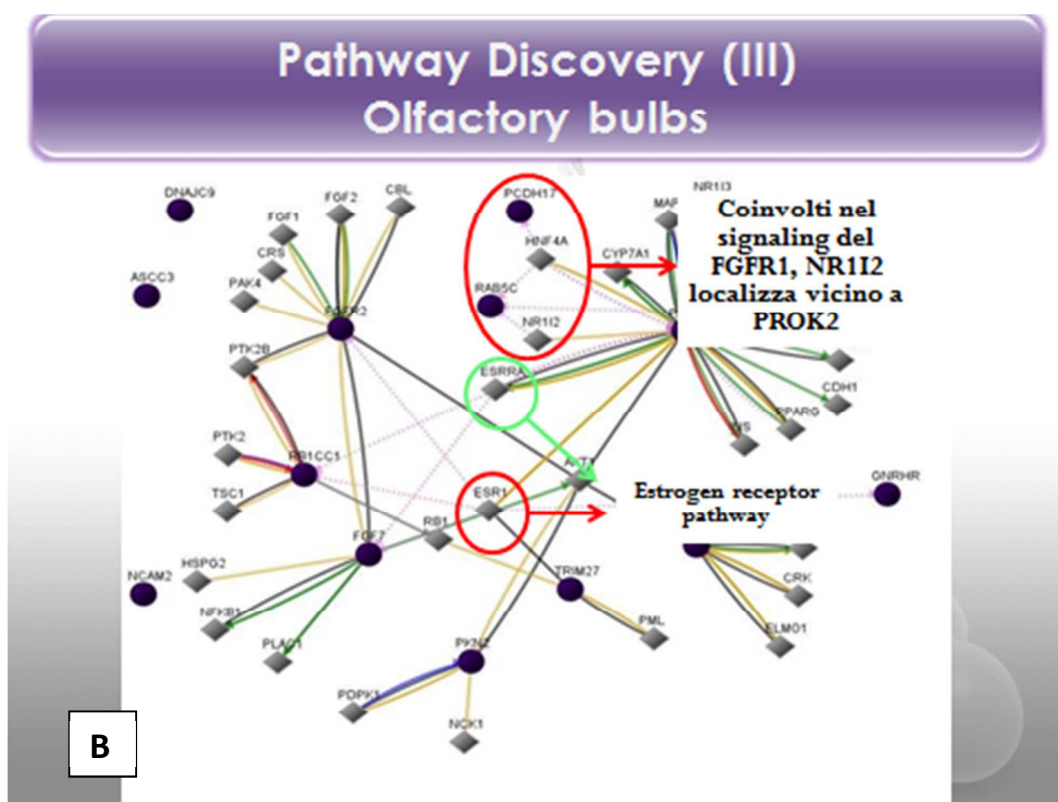
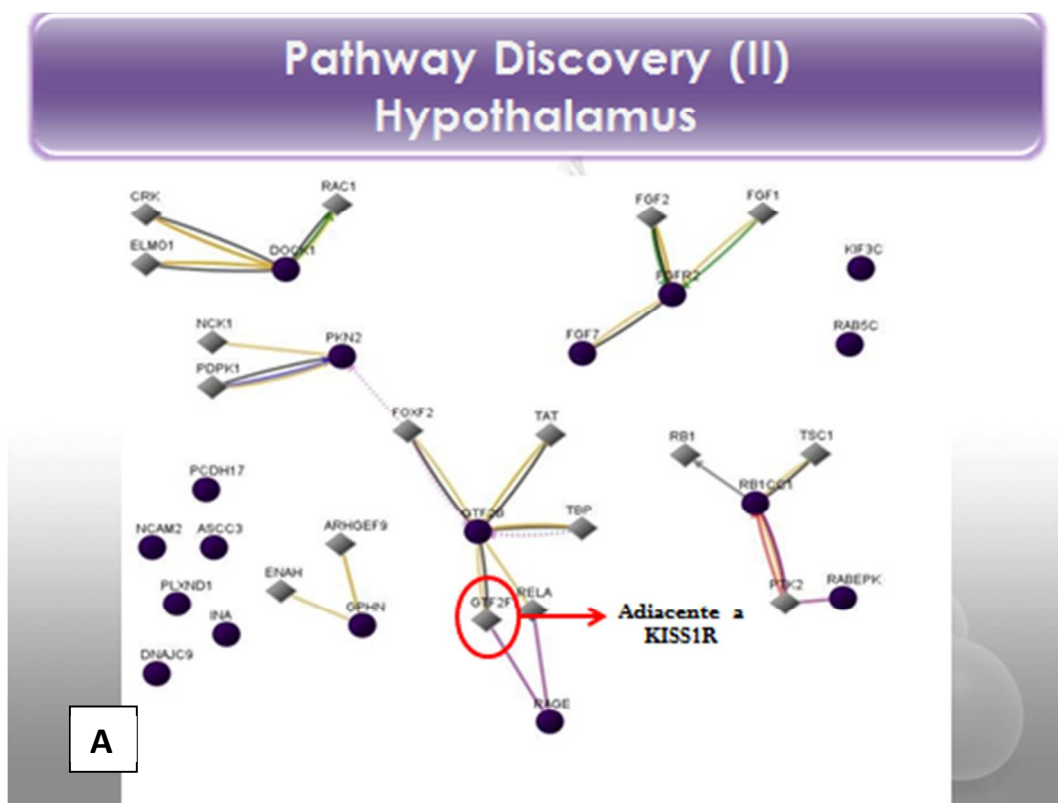
Il seguente schema rappresenta il risultato ottenuto dall'analisi:



**Figura 30:** analisi di pathway discovery sui 60 geni identificati nell'analisi LOH.

La stessa cosa è stata fatta scremando i geni da analizzare in base alla loro espressione nei distretti interessati durante il processo di ontogenesi, migrazione e azione dei neuroni GnRH secernenti.

Quindi i geni ottenuti sono stati analizzati, filtrandoli prima per l'espressione ristretta a livello ipotalamico e successivamente a quello dei bulbi olfattori; che costituiscono rispettivamente la sede finale di localizzazione dei neuroni GnRH secernenti e la sede embrionale originale.



**Figura 31:** analisi di pathway discovery A) Distretto ipotalamico B) Bulbi olfattori



# *Discussione*

## SAGGI FUNZIONALI DELLE VARIANTI DI PROKR2

Lo screening genetico per sequenziamento diretto del gene PROKR2 sulla più vasta casistica italiana di ICH (217 pazienti), ha portato all'identificazione di sette varianti missenso, di cui tre (V158I, T260M, V334M) di nuova descrizione e quattro già note in letteratura (L173R, R268C, V274D, V331M); due varianti *frameshift* con l'introduzione di un codone di stop prematuro, di cui una identificata per la prima volta, 15fsX45, e una già nota in letteratura, 20fsX43. La frequenza delle varianti missenso di PROKR2 nella nostra casistica è dunque del 6%, in maniera concorde ai dati riportati in letteratura (Semple and Topaloglu, 2010a). I dati biochimici ottenuti relativamente all'effetto di tali mutazioni, unitamente all'alto grado di conservazione interspecie dei residui aminoacidici sostituiti (vedi figura 18), suggerisce un loro probabile effetto patogenetico nell'insorgenza del fenotipo clinico dei nostri pazienti. Tutte le varianti identificate sono presenti in eterozigosi, ad eccezione della variante omozigote V274D (Tabella 10). Al fine di escludere che tali sostituzioni possano essere dei polimorfismi presenti anche nella popolazione sana, sono stati analizzati 150 alleli di controllo fra i quali non è stata mai ritrovata nessuna delle varianti precedentemente identificate.

Per valutare l'effetto patogenetico delle varianti riscontrate, si è deciso di valutare la loro espressione in membrana e il loro effetto sulle vie di trasduzione del segnale accoppiate a tale recettore (cAMP e IP3).

Relativamente alla parte di studio dell'espressione in membrana, abbiamo deciso di utilizzare la tecnica della citofluorimetria di flusso utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro un piccolo Tag che abbiamo inserito in frame alla porzione N-terminale del recettore. Tale analisi, a differenza dei dati finora riportati in letteratura e basati sull'impiego di metodiche ELISA o Western blot, permette una valutazione diretta della proteina in membrana e nella sua conformazione tridimensionale. Le analisi sono state inoltre condotte sia in cellule permeabilizzate che non permettendoci di valutare, in caso di differenze di espressione, se di trattasse di un difetto di trascrizione o un difetto di trasporto o ricircolo in membrana della proteina stessa. I risultati ottenuti da questa prima analisi hanno mostrato come nessuna delle sette varianti studiate venga completamente degradata o ritenuta all'interno della cellula. Tuttavia le varianti L173R, T260M, R268C e V274D causano una notevole riduzione dell'espressione della proteina in membrana, compresa tra il 44 e il 65%, mentre il mutante V334M mostra un'espressione eccedente quella del *wt* (127%). Infine i costrutti V158I e V331M hanno un livello di espressione paragonabile al recettore *wt*.



Riguardo gli studi funzionali effettuati *in vitro*, è anzitutto da sottolineare l'aspetto originale di questo studio rispetto a quelli finora pubblicati sulle varianti di PROKR2 individuate nei pazienti con ICH (Pitteloud et al., 2007b; Monnier et al., 2009; Abreu et al., 2008) rappresentato dalla valutazione di entrambe le vie di trasduzione di segnale legate a questo recettore accoppiato a proteina G. Mentre finora è stata studiata unicamente la via di attivazione legata alla proteina  $G_q$ , nel nostro studio abbiamo valutato anche l'attivazione della proteina  $G_s$  e il suo secondo messaggero cAMP. Dai dati della curve concentrazione-effetto appare chiaro come i mutanti L173R e V274D abbiano una completa incapacità di attivare la via di trasduzione legata alla proteina  $G_s$  con conseguente mancato accumulo di cAMP intracellulare anche ad alte dosi di stimolo. Il mutante V334M presenta invece solo una parziale compromissione del segnale tramite cAMP rispetto al recettore *wt*. Mentre le restanti varianti (V158I, T260M, R268C e V331M) non alterano in maniera significativa la funzionalità del recettore (vedi figura 22). L'altra via di traduzione del segnale (IP3-IP1) è stata valutata tramite HTRF-FRET, quantificando il livelli intracellulari di IP1. Tutte le altre varianti identificate, ad eccezione del mutante V158I che appare del tutto simile al *wt*, causano una riduzione del segnale mediato dalla proteina  $G_q$ , con un aumento massimo dell' $EC_{50}$  superiore a un logaritmo per i mutanti T260M, R268C e V274D (vedi figura 21). Queste tre varianti sono localizzate a livello del terzo *loop* intracellulare (ICL3), noto per essere coinvolto nella zona di legame delle proteine G che trasducono a valle il segnale attivatore. (Claus et al., 2006) Si può quindi ipotizzare che la diminuzione del segnale causata dalle tre varianti sia implicabile ad una mancata capacità del recettore di legare le proteine  $G_q$ .

Considerando i valori di  $EC_{50}$  relativi al cAMP, all'IP3 e all'espressione del recettore in membrana è stato creato un punteggio (calcolato per ogni variante come descritto nel capitolo "Materiali e Metodi") in grado di evidenziare i caratteri funzionali relativamente a ogni singolo costrutto. Delle varianti analizzate, la V158I è quella che sembra determinare il minor effetto su espressione e funzionalità del recettore, come dimostrato dal suo specifico score che si discosta in minima misura da quello pieno del *wt*. Le varianti, T260M, R268C, V331M e V334M sono caratterizzate dall'inibizione di una sola via di trasduzione del segnale e presentano dei valori di *score* funzionale mediamente ridotti rispetto al *wt* (fra il 30% e il 55% di attività rispetto al recettore *wt*). Infine le due varianti L173R e V247D mostrano una ridotta attività connessa ad entrambe le vie di trasduzione e presentano quindi una riduzione più marcata dello *score* funzionale; pari al 10% di attività nel primo caso e praticamente pari a 0 % nel secondo. La variante V274D, infatti, mostra un netto aumento della  $EC_{50}$  nelle due vie e anche una significativa riduzione dell'espressione

in membrana che ne determina uno *score* funzionale ridotto quasi del 100%; inoltre essendo presente come variante in omozigosi potrebbe essere sufficiente di per sé a dare un fenotipo di ipogonadismo centrale. La sostituzione V334M, invece, pur determinando un aumento delle due EC<sub>50</sub>, presenta dei livelli di espressione in membrana maggiori rispetto al *wt*, ottenendo così nell'insieme uno *score* che mostra una riduzione funzionale pari a circa il 55% del *wt*. La variante L173R invece, mostra una completa compromissione della via di trasduzione cAMP-mediata, mentre mantiene praticamente inalterato il *signalling* sulla via dell'IP1. Ciò dimostra, per la prima volta che anche in mancanza di una compromissione della via dell'IP1, modificazioni a carico della via di trasduzione del cAMP possano essere di fondamentale importanza nella patogenesi dell'ICH. E' del tutto evidente quindi, che solo lo studio di entrambe le vie di trasduzione possa consentire di stimare correttamente il reale impatto patogenetico delle varianti trovate nei nostri pazienti.

I dati relativi a questi due saggi, ci fanno quindi ipotizzare che tutte le varianti dovute alle mutazioni missenso studiate possano avere un effetto funzionale e quindi un ruolo patogenetico nello sviluppo dell'ICH. Dato che nessuna di queste varianti identificate è localizzata a livello dei *loops* extracellulari, deputati al legame del peptide Prok2, è possibile ipotizzare che la capacità di legame fra il ligando e il recettore rimanga inalterata. Perciò è verosimile che la riduzione nell'attivazione del recettore sia da attribuire piuttosto ad una minore o assente capacità di interagire con le proteine G e di attivare secondariamente la cascata di trasduzione del segnale.

I risultati da noi ottenuti confermano le frequenze relative a PROKR2 riportate in letteratura e chiariscono maggiormente il ruolo delle varianti associate a questo recettore nella patogenesi dell'ICH e si aggiungono ai dati già pubblicati in letteratura, ampliando la lista delle 27 mutazioni di PROKR2 identificate finora (fonte <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>).

Questi dati dimostrano inoltre che tali varianti non colpiscono solamente il pathway mediato dalle proteine G<sub>q</sub>, come già descritto in precedenza da altri gruppi (Cole et al., 2008a; Monnier et al., 2009), ma anche quello mediato dalle proteine G<sub>s</sub>. Viene quindi confermata l'importanza di questa seconda via di trasduzione, suggerendo che per il normale sviluppo, funzionamento e migrazione dei neuroni GnRH-secrenti sia necessaria l'integrità di entrambe le vie di trasduzione del segnale accoppiate al PROKR2.

Dal momento che le varianti di PROKR2 sono state tutte identificate allo stato eterozigote, ad eccezione della V274D, rimane da stabilire in quale maniera una sola copia difettosa di PROKR2 contribuisca al fenotipo ICH. Una delle possibili

spiegazioni è il meccanismo dell'aploinsufficienza. D'altro canto, però, come ormai noto dalla letteratura, questi difetti sembrano riconoscere una eziopatogenesi oligogenica (Sykiotis G et al, PNAS 2012; Bonomi et al, 2012). Nel caso dei nostri pazienti siamo quindi andati a verificare la presenza di varianti associate a carico degli altri geni noti quali geni causativi di ICH. La valutazione dei geni PROKR2, FGFR1, KAL1, FGF8, KISS1R, KISS1, GNRH1, GNRH2, GNRHR, TAC3 e TACR3 non ha però mostrato altre alterazioni in nessuno dei pazienti in analisi che risultano quindi portatori del solo difetto di PROKR2 in eterozigosi. Non è comunque escluso che sia implicato un'altro meccanismo genetico o un'altro gene ad oggi ancora sconosciuto.

Grazie alla collaborazione instaurata con un modellist bioinformatico è stato elaborato dal nostro laboratorio un modello molecolare del recettore PROKR2, disegnato sulla struttura cristallina del recettore beta2-adrenergico, che ha permesso di individuare sei residui aminoacidici di fondamentale importanza per la struttura e la funzione di PROKR2. Gli aminoacidi E110, R153 ed E319 appartenenti ai domini transmembrana TM2, TM3 e TM7, rispettivamente, interagiscono tra di loro per stabilizzare e compattare la struttura tridimensionale del recettore in membrana. Gli aminoacidi N329, T330 e F333, invece, formano il motivo NTxxF, analogo al motivo NPxxY altamente conservato in tutti i recettori accoppiati a proteine G, implicato nella determinazione dello stato attivo di questa classe di recettori. Si può quindi ipotizzare che una mutazione localizzata a livello di questo motivo abbia degli effetti potenzialmente molto dannosi sull'attività del recettore. Tale ipotesi è confermata dai nostri dati: la variante V331M è infatti localizzata a livello di tale dominio e determina una marcata riduzione del signaling mediato dall'IP1 intracellulare, dopo stimolazione del recettore.

## GENOTYPING DEI PAZIENTI ICH

### ANALISI GLOBALE

Negli ultimi anni sempre più spesso ci si è affidati a tecniche di biologia molecolare in grado di valutare contemporaneamente un elevato numero di SNPs e di CNVs, al fine di identificare zone genomiche di interesse nelle patologie multigeniche complesse. Nel caso dei *Genome-Wide Association Studies* (GWAS), viene fatto un paragone statistico fra un gruppo di casi e uno di controlli, individuando quindi tutti i genotipi diversamente rappresentati fra i due gruppi.

Per quanto riguarda i dati da noi ottenuti, nonostante la numerosità campionaria dei controlli (1864), è evidente come, a causa del ridotto numero di casi fino ad ora

analizzati, molti dei geni identificati siano dei falsi positivi. Questo coincide con quanto visualizzato dal Q-Q plot (vedi Materiali e Metodi) dove appare evidente un discostamento fra i valori di significatività attesi per ogni singola posizione genomica e quelli osservati a bassi valori di significatività. Solitamente inoltre, nel caso di studi caso/controllo con un'elevata numerosità (ad es: 2000 vs 2000) i valori di significatività (riportati per ogni singolo cromosoma sul Manhattan plot) risultano poco dispersi e appiattiti sull'asse delle X. Questo è dovuto al fatto che il vasto campione statistico fa sì che un'eventuale varianza casuale dei valori di significatività, sia ridotta al minimo. Nel caso di target genetici reali inoltre, spesso si ha un picco di significatività che comprende più di uno SNP. Nel nostro caso invece gli SNPs significativi non mostrano concordanza con quelli adiacenti, suggerendo che alcuni dei geni candidati identificati possano essere dei falsi positivi. Per una maggiore attendibilità dei dati sarebbe necessario incrementare la numerosità del campione. Ovviamente aumentando la numerosità campionaria del gruppo dei casi, si avrebbero dei valori più attendibili.

Facendo l'analisi multivariata dei genotipi è possibile però verificare come i campioni provenienti da due famiglie ICH abbiano un comportamento statistico (relativo alla varianza), decisamente differente dagli altri campioni (vedi figura 24). Nello specifico una delle due famiglie individuate è quella di una paziente nella quale è stata identificata una perdita di eterozigosità quasi completa del braccio *p* del cromosoma 18. E' evidente che grosse alterazioni citogenetiche, in cui si abbia la presenza di blocchi aploipici ripetuti, introducano una riduzione della varianza del campione. Ciò determina che questi pazienti clusterizzino separatamente rispetto alla popolazione di controllo. Quindi un prima considerazione qualitativa, che si può fare relativamente al gruppo dei pazienti ICH è che questi mostrano una eterozigosità autosomica ridotta, rispetto al gruppo dei controlli. Il significato biologico di questa osservazione è che il genoma di questi pazienti è meno "assortito" e quindi verosimilmente più prone a contenere varianti patogenetiche recessive.

A livello globale, l'altro dato interessante che emerge è che la frequenza e l'ampiezza delle delezioni (dimensioni considerate 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 5000 Kb), specialmente nel caso di delezioni in singola copia, è statisticamente maggiore nei casi rispetto ai controlli. (vedi grafici in figura 26)

Questo può essere visto come un indice di un genoma con dei difetti maggiori che può portare conseguentemente all'espressione di un fenotipo patologico, in quanto avendo grosse delezioni i pazienti ICH corrono il rischio di avere deleti dei *loci*

(ancora non noti) coinvolti nella patologia. Ciò, come già detto precedentemente per l'analisi genotipica multivariata, può essere dovuto al *bias* derivante dalla scarsa numerosità dei genotipi dei pazienti e nonostante esista comunque una significatività statistica, sarebbe opportuno aumentare il campione in analisi per verificare se i dati vengono riconfermati. Le cause di tale fenomeno sono probabilmente ascrivibili al fatto che fra i campioni in analisi alcuni provengono da famiglie di consanguinei nelle quali si ha un arricchimento delle grosse delezioni che poi possono portare all'espressione del fenotipo ICH.

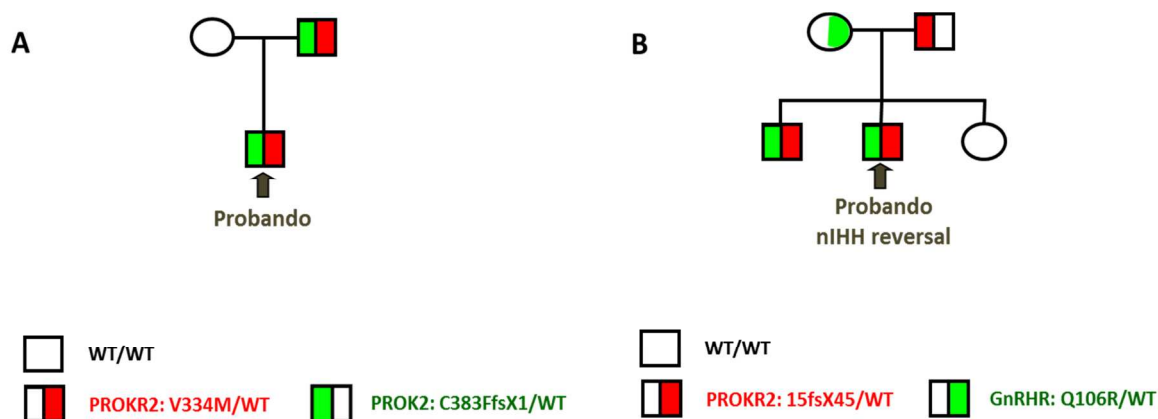
Allo stesso modo una distorsione dei dati ottenuti è data dal fatto che per molte analisi, a causa dell'eterogeneità del gruppo dei casi e dei controlli relativamente al sesso, non è stato possibile estenderle ai cromosomi sessuali e nella fattispecie al cromosoma X. Considerando che la frequenza della patologia è di 1:8000 nei maschi e di 1:40000 nelle femmine (Dode and Hardelin, 2009) e che solo uno dei 14 geni causativi di ICH, ad oggi identificati, risiede sul cromosoma X, è verosimile pensare che esista almeno un altro *locus* su questo cromosoma la cui alterazione possa portare ad un fenotipo di ipogonadismo ipogonadotropo.

Il fatto che necessariamente debba esistere un altro fattore genetico causativo, oltre a quelli già identificati, è evidente per il fatto che circa il 65% dei casi analizzati non rechi nessuna alterazione significativa a carico dei geni ICH noti. L'enorme variabilità fenotipica anche intrafamiliare di soggetti con il medesimo genotipo è un'ulteriore conferma della presenza di altri meccanismi genetici ancora da scoprire. Un chiaro esempio viene anche dai seguenti due casi clinici della nostra casistica con genotipo identico ma fenotipo discordante, lasciando supporre che la differenza sia dovuta a un *locus* ancora ignoto e verosimilmente localizzato sul cromosoma X.

A supporto di questa ipotesi si può considerare il caso riportato in figura 32 B, nel quale un paziente maschio recante due mutazioni a carico rispettivamente dei geni PROKR2 e GNRHR, mostra però un fenotipo discordante dal fratello che presenta le stesse due varianti. Inoltre la madre dei pazienti presenta una macroscopica alterazione sul cromosoma X (vedi figura 29). Questo dato risulta particolarmente interessante data la presenza del gene KAL-1, uno dei geni maggiormente coinvolti in KS, e l'unico delle forme X-linked, che mappa sul cromosoma X.

Ma dato che il probando, affetto da un ipogonadismo ipogonadotropo normosmico, non ha riportato prevedibilmente varianti a carico del gene KAL1, ciò può implicare che ci sia un altro locus nella stessa zona in grado di causare un fenotipo di ipogonadismo ipogonadotropo. L'analisi completa tramite sequenziamento di nuova generazione per tale paziente, il fratello e la madre potrà portare all'identificazioni e

alla discriminazione di eventuali nuove varianti patogenetiche presenti in questa zona genomica.



**Figura 32:** pedigree ICH con fenotipi discordanti. A) Padre e figlio portano le stesse mutazioni in PROK2 e PROKR2, ma solo il figlio è affetto da ICH. B) Due fratelli condividono le stesse varianti in PROKR2 e nel GNRHR, solo uno dei due però ha un deficit nell'asse HPG. Da notare che il paziente dopo la sospensione del trattamento con terapia ormonale sostitutiva, ha mostrato una reversione del fenotipo patologico tornando ad avere valori normali di gonadotropine e testosterone.

## ANALISI microRNA

Combinando i risultati ottenuti dalla tre analisi effettuate (SNPs, CNVs, LOHs), emerge un possibile coinvolgimento dei microRNA nella patogenesi dell'ICH. Ad oggi in letteratura non sono mai stati riportati dati relativi ad alterazioni o misregolazioni dei microRNA come possibile meccanismo non genetico causativo di ICH. Dal nostro studio appaiono invece 4 microRNA che potrebbero essere implicati nella patogenesi di ICH. Questo dato andrà ulteriormente validato mediante metodiche alternative come mediante Real Time PCR in tessuti specifici. Inoltre per approfondire questo aspetto si potrebbe pensare ad un microRNA-*profiling* completo su modelli murini KO con fenotipi Kallmann-*like*.

## SNPs

Dei 13 target identificati solo due sono risultati essere realmente interessanti per funzione ed espressione: CNTNAP2 e GPC5. Il primo candidato, il gene CNTNAP2, ha un'espressione parzialmente sovrapponibile alle aree di sviluppo ed azione dei neuroni GnRH secernenti ed ha un ruolo nello sviluppo della zona talamica e più in generale nello sviluppo del cervello durante il periodo embrionale. L'assenza ad oggi di un modello animale in cui sia stato geneticamente spento questo gene non ci rende possibile sapere se l'assenza di questo gene si associ, in vivo, ad un ipogonadismo centrale. Tuttavia, analisi di *linkage* su famiglie di pazienti con autismo hanno

evidenziato che varianti a carico di questo gene correlano con un'aumentata suscettibilità per questa patologia. (Alarcon et al., 2008) Questo si rivela particolarmente interessante, in quanto in una delle famiglie ICH selezionate nella nostra casistica, ricorrono dei fenotipi di autismo e/o di ritardi mentali psicomotori che sarebbero quindi compatibili con le osservazioni riportate in letterature relativamente al ruolo biologico e molecolare della proteina *Conctactin-Associated Protein-Like 2* (CNTNAP2).

Un altro candidato interessante è il *locus* GPC5, un gene con un'espressione praticamente ubiquitaria che ad oggi è stato visto essere coinvolto in tumori quali linfomi follicolari, delle cellule B ed in carcinomi polmonari di tipo *small cell* e *non-small*. (Mao et al., 2002) . La proteina per cui questo gene codifica, proteina denominata *gpc*, lega gli HPSG sia nel cervello del feto, che, in misura minore, in quello dell'adulto. (Veugelers et al., 1997) Questo dato risulta particolarmente interessante alla luce di un recente lavoro (Tornberg et al., 2011) in cui si dimostra che il gene Heparan-sulphate 6-sulphotransferase 1 (HS6ST1), coinvolto nei processi di modificazione degli eparansolfati, rappresenta una nuova causa genetica di ICH. Pertanto si potrebbe ipotizzare che GPC5 svolga un ruolo analogo in questo pathway e che quindi possa essere implicato nella patogenesi genetica di ICH. Inoltre GPC5 si trova in un cluster genomico in cui è presente anche il gene HS6ST3 che ha un'elevata omologia di sequenza con l'HS6ST1 e probabilmente un ruolo biologico simile. Inoltre coerentemente col ruolo ipotizzato per i glipicani durante lo sviluppo, si è visto che l'espressione di queste molecole nell'embriogenesi coincide con quella di altri fattori di sviluppo quali ad esempio gli FGF e i BMP. Considerando quindi il ruolo preminente che il pathway dell'FGFR1 ricopre nella patogenesi dell'ICH è interessante osservare che il pattern d'espressione dei glipicani si sovrapponga a quello degli FGF durante lo sviluppo embrionale, ad indicare una probabile interazione concertata dei due sistemi durante lo sviluppo del CNS ed in particolar modo del sistema dei neuroni GnRH-secernenti. Purtroppo come nel caso precedente non esistono ad oggi modelli murini in grado di validare *in vivo* queste osservazioni.

## CNVs

Dei 17 target identificati, anche in questo caso, solo due sembrano avere una rilevanza biologico-funzionale: i geni RAB39 e PPFIA2.

Il primo candidato RAB39B, è un gene che codifica per una proteina coinvolta nei processi di *trafficking* intracellulare, fortemente espressa a livello del sistema nervoso centrale ed in particolar modo nell'ippocampo. Questo gene è associato al ritardo

mentale e a livello cellulare la sua down-regolazione porta a una riduzione nel numero di neuriti e ad una minore formazione di sinapsi (Giannandrea et al., 2010).

Il gene PPFIA2, invece, codifica per un recettore tirosin-chinasico implicato nei processi di *axon guidance* (Serra-Pages et al., 1998), ma il modello murino di questo gene non mostra un fenotipo che potrebbe far pensare ad un ipogonadismo centrale, in quanto i topi non mostrano una ridotta fertilità.

## LOH

Delle analisi effettuate, quella delle zone in perdita di eterozigosità sembra essere quella più promettente in quanto ha permesso di identificare numerosi candidati, la maggior parte dei quali è coerente con un possibile ruolo funzionale nella patogenesi dell'ICH.

Infatti osservando i geni identificati e riportati in tabella 16, ritroviamo dei pathway di interesse:

1. FGFR1 pathway: i geni identificati sono l'FGFR2, l'FGF7 e l'FGF10. Il primo è un recettore con elevata omologia di sequenza con l'FGFR1. Sono già state identificate mutazioni a carico di questo gene che danno uno spettro clinico estremamente variabile, che spazia dai difetti nella formazione del cranio (craniosinostosi) alla sindattilia e più in generale a difetti dello sviluppo osseo. Ad oggi però non sono stati riportati dei sintomi che possono essere ricollegati ad un quadro di ipogonadismo centrale idiopatico. Per quanto concerne invece i due ligandi, l'FGF7 sembra essere un fattore di crescita chetatino-specifico, mentre l'FGF10 funge da fattore di crescita epiteliale nei polmoni e nelle ghiandole salivari.
2. Caderine e molecole di adesione (CAM): le proteine appartenenti a questa famiglia sono coinvolte nei processi di adesione cellulare mediati dagli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ . Mutazioni a carico della protocaderina 15 si associano a sordità congenita o alla sindrome di Usher, mentre è stato osservato che la protocaderina 17 è fortemente espressa durante lo sviluppo embrionale ed in particolar modo nell'ontogenesi dei bulbi olfattori (Williams et al., 2007). Un'altra molecola di adesione identificata è quella codificata dal gene NCAM2 (OCAM = *olfactory cellular adhesion molecule*), che esprime un prodotto coinvolto sia nello sviluppo neuronale, sia in quello dei bulbi olfattori ed in particolar modo nei processi di *axon guidance* dei neuroni olfattori (Yoshihara et al., 1997). Infine il gene DOCK1, altamente espresso nei bulbi olfattori la cui proteina è coinvolta nei processi di modificazione della membrana cellulare e perciò verosimilmente



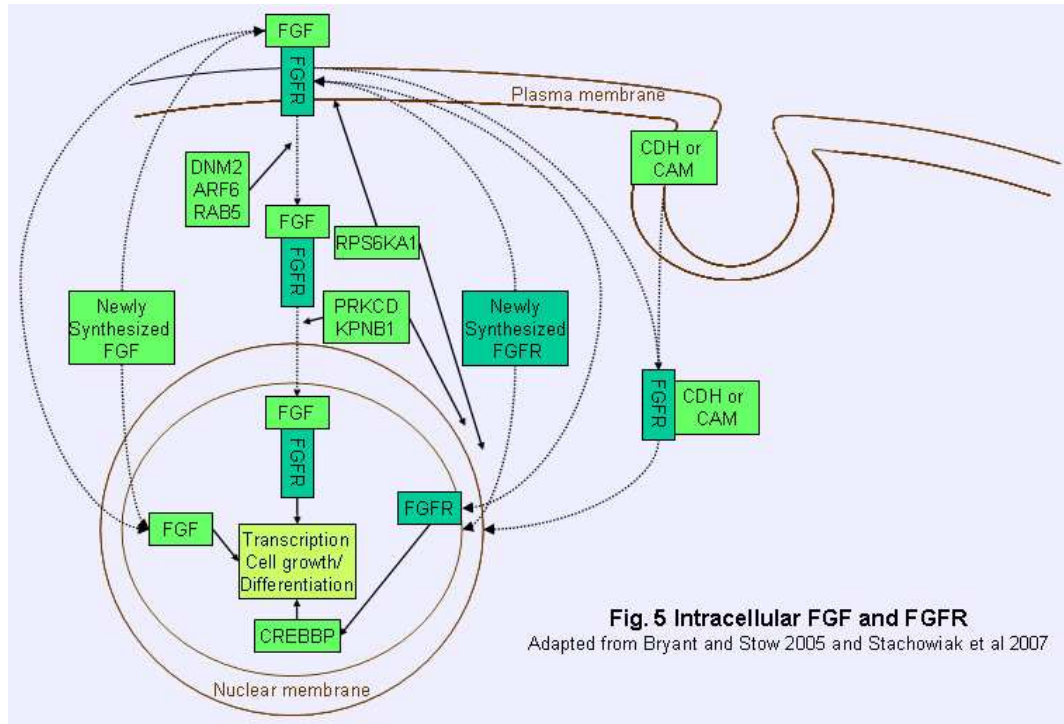
coinvolta nei processi di migrazione cellulare. Considerando quindi, che circa la metà dei pazienti ICH hanno deficit olfattori dovuti all'aplasia dei bulbi olfattori (o ad una ipoplasia) e che in alcuni casi sono stati riportati difetti uditivi associati ad ipogonadismo ipogonadotropo, questi due geni costituiscono dei candidati interessanti da valutare per sequenziamento diretto. Inoltre, dal momento che una mancata o non corretta migrazione dei neuroni GnRH è alla base di una parte di ICH, ci si può aspettare che le caderine, molecole fondamentali per la comunicazione cellula-cellula e per il rimodellamento della matrice extracellulare, possano essere altrettanto ottimi candidati da studiare per ICH. .

3. Recettori e ligandi altamente espressi nel cervello, coinvolti nei processi di differenziamento del sistema nervoso centrale (CNS), dell'ipotalamo e dell'ipofisi: il gene GPR17, che codifica per un recettore espresso a livello cerebrale, sembra essere coinvolto nel pathway dei leucotrieni nei processi di risposta allergici; il gene INA, altamente espresso nel CNS e nell'ipofisi, funge da fattore per la formazione degli assoni in tutto il CNS; i geni NALAAD2 ed NPBWR1, fortemente espressi nell'ipofisi, ma dalla funzione biologica ignota; il gene NPS, correlato con gli stati di ansia, iperattività e ipersessualità (Mochizuki et al., 2010); il gene NTNG1, appartenente alla famiglia delle netrine, espresso a livello talamico e coinvolto nella crescita assonale. Mutazioni a carico del gene NTNG1 possono essere associate alla sindrome di Rett (Lin et al., 2003); il PTPRD è un recettore tirosin-chinasico che è implicato nei processi di crescita dei neuriti e di guida assonale (Uetani et al., 2000).
4. Geni associati a difetti della linea mediana: MID1, OFCC1 e OFD1. Il gene MID1 che codifica per una proteina associata alla formazione dei microtubuli nel citoplasma, le mutazioni a carico di questo gene causano la sindrome di Optiz, una patologia autosomica dominante comprendente ipertelorismo ed ernie, e nei maschi ipospadia, criptorchidismo, scroto bifido, ipogonadismo, palatoschisi, schisi della faringe, difetti cardiaci e agenesia del corpo calloso (Cainarca et al., 1999). Breakpoint cromosomici che coinvolgono OFCC1 causano schisi orofacciale (Davies et al., 2004). Mentre alterazioni a carico del gene OFD1 causano la sindrome orofacciodigitale I, che è caratterizzata da difetti nella linea mediana del viso, della cavità orale, delle dita, problemi nella dentizione e difetti nel sistema nervoso centrale (Feather et al., 1997). Come nel caso dei difetti della funzione olfattoria, anche nel caso dei difetti della linea mediana c'è una forte associazione fra questo tipo di difetti e l'ipogonadismo centrale idiopatico, perciò questi geni costituiscono dei candidati preferenziali per lo screening genetico diretto, in particolar

modo il gene MID1 in cui oltre all'ipogonadismo, sono presenti anche altri sintomi peculiari, quali il criptorchidismo e l'ipospadia; e il gene OFD in quanto essendo sul cromosoma X e avendo una modalità di trasmissione di tipo *X-linked* nei casi della sindrome OFD di tipo I, concorderebbe con i dati riportati in letteratura che vedono una frequenza da 4 a 7 maggiore di ICH nei maschi rispetto che nelle donne.

5. Geni associati alla sindrome di Prader-Willi e sindrome di Angelmann: GABRB3 e NDNL2. Il gene GABRB3 codifica per un recettore implicato nello sviluppo dei neuroni GABA-ergici, questo suo ruolo probabilmente è alterato nei deficit neuronali associati alla sindrome di Angelmann; inoltre variazioni genetiche in questo locus possono associare a palatoschisi (Homanics et al., 1997). Il gene NDNL2 invece codifica per una proteina con un'elevata omologia di sequenza con la Necdina (uno dei geni candidati per la suscettibilità ad ICH), una molecola che è espressa nei neuroni GnRH secernenti regolandone il loro differenziamento durante lo sviluppo embrionale (Miller et al., 2009).
6. Plexine: PLXNA4, PLXNB3, PLXNC1, PLXND1. Questi geni codificano per delle proteine appartenenti alla famiglia delle plexine, le quali, assieme alle neuropiline e ai loro ligandi (le semaforine), sono delle molecole in grado di regolare i processi di migrazione cellulare ed in particolar modo dei neuroni GnRH-secernenti durante lo sviluppo embrionale. E' del tutto evidente quindi come tali geni costituiscano dei candidati di interesse per l'eziopatogenesi dell'ICH (Messina et al., 2011).
7. RAB family: RAB23, RAB5C, RABEPK. Le proteine appartenenti a questa famiglia svolgono un ruolo essenziale nei processi che mediano l'indirizzamento e la fusione delle vescicole endocitotiche e/o secretorie. Per quanto riguarda RAB23, questo gene codifica per una proteina che ha un ruolo di regolatore negativo del pathway Sonic Hedgehog nel differenziamento delle cellule neurali dorsali. Inoltre mutazioni a carico di questo gene sono associate alla sindrome di Carpenter (una sindrome autosomica recessiva, nota anche come acrocefalopolioidattilia) che fra i suoi sintomi clinici più caratteristici presenta un ipogonadismo ed un ipogenitalismo. Il gene RAB5C codifica per una proteina che facilita l'internalizzazione dell'FGFR1 di membrana negli endosomi ed in seconda battuta è necessario per la traslocazione nucleare che porta al *signalling* a valle del recettore stesso (Bryant and Stow, 2005; Stachowiak et al., 2007). Questo candidato è particolarmente interessante in quanto, qualora si abbiano delle mutazioni in eterozigosi di FGFR1, si può aggiungere a questa

compromissione parziale un ulteriore difetto genetico in grado di compromettere la via di internalizzazione e di recycling di questo recettore portando all'espressione di un fenotipo patologico (vedi figura 33). Questo potrebbe spiegare l'estrema variabilità fenotipica correlata con le varianti patogenetiche di FGFR1 (Pitteloud et al., 2007a).

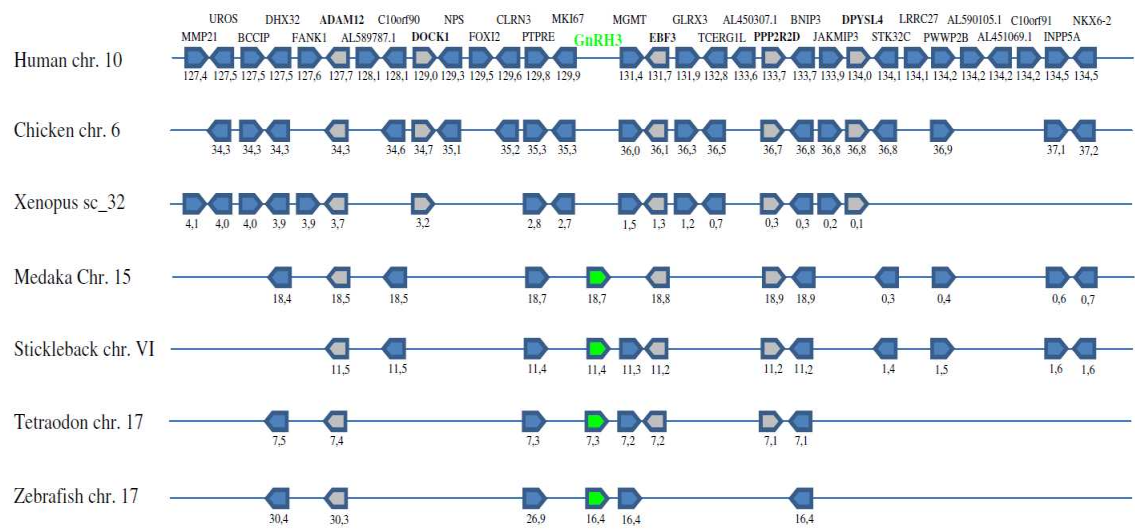


**Figura 33:** Caderine, molecole di adesione cellulare e Rab associate al pathway di internalizzazione dell'FGFR1.

Infine il gene RABEPK (o *RAB9 effector*) come nel caso delle due precedenti RAB codifica per una proteina coinvolta nei processi di vescicolazione, ma in questo caso in maniera specifica per il sistema di passaggio dagli endosomi al *trans-Golgi network* (TGN); in questo caso non sembra verosimile il coinvolgimento di questo gene nell'eziopatogenesi dell'ICH (Diaz et al., 1997).

Se si va valutare la localizzazione citogenetica dei geni identificati, si osserva che 8 dei 60 target identificati si localizzano in un cluster genomico nella posizione 10q26.2, questo cluster conterrebbe lo pseudogene GNRH3, che è stato perso dai mammiferi nel corso dell'evoluzione, mentre è stato mantenuto ad esempio dai teleosti (vedi figura 34) (Tostivint, 2011). La cosa interessante da notare è che questo blocco genomico si è originato per un evento di duplicazione genica dal blocco primitivo contenente il GNRH1. Ciò può indicare come, nonostante la funzione del *locus* GNRH1 sia stata persa durante l'evoluzione, gli altri geni facenti parte di questo

cluster possano aver mantenuto e sviluppato nuove funzioni nel controllo della riproduzione.



**Fig. 4.** Synteny map comparing the orthologues of the GnRH3 locus and the genes flanking it in humans (*H. sapiens*), chicken (*G. gallus*), *Xenopus* (*X. tropicalis*), medaka (*O. latipes*), stickleback (*G. aculeatus*), tetraodon (*T. nigroviridis*) and zebrafish (*D. rerio*). Details are the same as in the Fig. 2. The detailed chromosomal locations of genes displayed in this map are included in Table S3.

**Figura 34:** conservazione evolutiva del blocco genomico 10q26.2 nel phylum dei cordati.

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il lavoro di tesi proposto presenta prima presenta diversi elementi di innovazione sia per la valutazione delle varianti individuate nel gene PROKR2 che nel tentativo di identificazione di nuovi geni candidati. La prima parte del lavoro svolto ha permesso di identificare 9 nuove varianti del gene PROKR2 e di studiarne con nuovi approcci sia l'espressione in membrana che la loro funzionalità in sistemi in vitro eterologhi mediante saggi che hanno testato la produzione di  $\text{Ca}^{2+}$ /IP3 3 per la prima volta di cAMP. Da questi studi appare chiaro come l'integrità di entrambe queste vie di segnale siano importanti per il corretto sviluppo e funzionamento dei neuroni GnRH secernenti e per l'attivazione dello sviluppo puberale. la seconda parte del lavoro di tesi, relativa al genotyping, ha mostrato come questa metodica rappresenti un buon metodo per la ricerca di nuovi determinanti genetici di ICH. Risulta infatti chiaro che per le patologie multi geniche è necessario usare degli approcci *genome wide*, che permettano di mappare tutto il genoma dei pazienti in analisi. Questo è di particolare interesse nel caso di patologie con una probabile componente autosomica recessiva poiché, usando la mappatura di omozigosità in parenti affetti è possibile restringere il campo delle zone genomiche da analizzare, considerando solo le porzioni condivise da tutti i probandi. Inoltre sfruttando la mappatura data dallo SNP *genotyping* è possibile fare un'analisi di linkage per identificare come il locus-malattia ipotetico segreggi nel corso delle varie generazioni.

Il limite di tale approccio però risiede nel fatto che per patologie multigeniche come l'ICH, in cui solitamente il fenotipo patologico è causato da mutazioni puntiformi e molto più raramente da eventi genetici più grossi (quali delezioni o riarrangiamenti cromosomici), è praticamente impossibile osservare una mutazione puntiforme in maniera diretta. L'identificazione di un locus candidato deve essere ottenuta per *linkage disequilibrium* o comunque dal confronto di un grosso gruppo di casi contro quello dei controlli. Tenendo però conto, che l'ipogonadismo centrale idiopatico è una patologia controevolutiva selezionata negativamente a livello di pressione selettiva, (in quanto gli individui affetti da ICH avranno ovviamente un ridotta *fitness*), è verosimile pensare che se si dovesse identificare un target molecolare con un'analisi GWAS, ciò sarà un fattore di suscettibilità per tale patologia e non una causa genetica diretta. Negli ultimi anni però si stanno sempre più affermando le cosiddette tecniche di sequenziamento di nuova generazione (*Next-generation*

*sequencing*) che rendono possibile un completo sequenziamento genomico a prezzi contenuti. L'utilizzo di queste tecniche sarà di fondamentale importanza per la scoperta di mutazioni *de novo* in geni ad oggi mai identificati come causativi per l'ipogonadismo centrale idiopatico. Per quanto riguarda invece l'analisi di un elevato numero di geni ed in secondo luogo la scoperta per via indiretta di candidati per la patologia di interesse, sono di particolare utilità i softwares bioinformatici in grado di fare pathway discovery. Nel caso dei nostri geni l'analisi effettuata ha rivelato che i geni analizzati hanno degli interattori comuni che convergono verso il recettore per gli estrogeni (ESR1) ed un fattore accessorio associato al recettore degli estrogeni (ESRRA). Questi dati indicano quindi un possibile coinvolgimento del pathway del recettore degli estrogeni nella regolazione della fisiologia dei neuroni GnRH secernenti. Questa ipotesi ci viene confermata anche da un lavoro riportato in letteratura in cui si osserva che una modulazione farmacologica negativa del recettore degli estrogeni può fortemente inibire la neurogenesi dei neuroni GnRH (Agca et al., 2008).

Concludendo quindi, si sottolinea come, sia lo SNPs che il CNVs *genotyping* costituiscono un metodo valido per la ricerca di nuovi geni per ICH e in generale per le patologie rare. Nello specifico, particolarmente promettente, nonostante la ridotta casistica, è l'analisi di LOH per i casi familiari; che ha permesso l'identificazione di geni candidati interessanti da analizzare tramite sequenziamento diretto. Inoltre software bioinformatici per *gene ontology* e *pathway discovery* possono aiutare nell'identificazione di candidati per via indiretta.

# *Bibliografia*

1. Abreu AP, Trarbach EB, de CM, Frade Costa EM, Versiani B, Matias Baptista MT, Garmes HM, Mendonca BB, Latronico AC. 2008. Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4113-4118.
2. Agca E, Batailler M, Tillet Y, Chemineau P, Duittoz AH. 2008. Modulation of estrogen receptors during development inhibits neurogenesis of precursors to GnRH-1 neurones: in vitro studies with explants of ovine olfactory placode. *Brain Res* 1223:34-41.
3. Alarcon M, Abrahams BS, Stone JL, Duvall JA, Perederiy JV, Bomar JM, Sebat J, Wigler M, Martin CL, Ledbetter DH, Nelson SF, Cantor RM, Geschwind DH. 2008. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 82:150-159.
4. Bajpai A, Menon PS. 2011. Contemporary issues in precocious puberty. *Indian J Endocrinol Metab* 15 Suppl 3:S172-S179.
5. Bianco SD, Kaiser UB. 2009. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol* 5:569-576.
6. Bonomi M, Libri DV, Guizzardi F, Guarducci E, Maiolo E, Pignatti E, Asci R, Persani L. 2011. New understandings of the genetic basis of isolated idiopathic central hypogonadism. *Asian J Androl*.
7. Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, Chanson P, Lombes M, Millar RP, Guiochon-Mantel A, Young J. 2009. Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N Engl J Med* 360:2742-2748.
8. Bryant DM, Stow JL. 2005. Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor. *Traffic* 6:947-954.
9. Bryant DM, Wylie FG, Stow JL. 2005. Regulation of endocytosis, nuclear translocation, and signaling of fibroblast growth factor receptor 1 by E-cadherin. *Mol Biol Cell* 16:14-23.
10. Cainarca S, Messali S, Ballabio A, Meroni G. 1999. Functional characterization of the Opitz syndrome gene product (midin): evidence for homodimerization and association with microtubules throughout the cell cycle. *Hum Mol Genet* 8:1387-1396.
11. Cattanach BM, Iddon CA, Charlton HM, Chiappa SA, Fink G. 1977. Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature* 269:338-340.
12. Chan YM, Broder-Fingert S, Seminara SB. 2009a. Reproductive functions of kisspeptin and Gpr54 across the life cycle of mice and men. *Peptides* 30:42-48.
13. Chan YM, De GA, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiaras S, Gaspert A, Lavoie HB, Wu CH, Crowley WF, Jr., Amory JK, Pitteloud N, Seminara SB. 2009b. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:11703-11708.
14. Chawla MK, Gutierrez GM, Young WS, III, McMullen NT, Rance NE. 1997. Localization of neurons expressing substance P and neurokinin B gene transcripts in the human hypothalamus and basal forebrain. *J Comp Neurol* 384:429-442.
15. Chen J, Kuei C, Sutton S, Wilson S, Yu J, Kamme F, Mazur C, Lovenberg T, Liu C. 2005. Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol Pharmacol* 67:2070-2076.
16. Chibuk TK, Bischof JM, Wevrick R. 2001. A necdin/MAGE-like gene in the chromosome 15 autism susceptibility region: expression, imprinting, and mapping of the human and mouse orthologues. *BMC Genet* 2:22.
17. Chung WC, Moyle SS, Tsai PS. 2008. Fibroblast growth factor 8 signaling through fibroblast growth factor receptor 1 is required for the emergence of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 149:4997-5003.
18. Clarkson J, d'Anglemont dT, X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. 2009. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 21:673-682.
19. Clarkson J, Herbison AE. 2009. Oestrogen, kisspeptin, GPR54 and the pre-ovulatory luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol* 21:305-311.
20. Claus M, Neumann S, Kleinau G, Krause G, Paschke R. 2006. Structural determinants for G-protein activation and specificity in the third intracellular loop of the thyroid-stimulating hormone receptor. *J Mol Med (Berl)* 84:943-954.
21. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D, Hughes VA, Dwyer AA, Raivio T, Hayes FJ, Seminara SB, Huot C, Alos N, Speiser P, Takeshita A, Van VG, Pearce S, Crowley WF, Jr., Zhou QY, Pitteloud N. 2008a. Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3551-3559.
22. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D, Hughes VA, Dwyer AA, Raivio T, Hayes FJ, Seminara SB, Huot C, Alos N, Speiser P, Takeshita A, Van VG, Pearce S, Crowley WF, Jr., Zhou QY, Pitteloud N. 2008b. Mutations in prokineticin



2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3551-3559.

23. Corradi A, Croci L, Broccoli V, Zecchini S, Previtali S, Wurst W, Amadio S, Maggi R, Quattrini A, Consalez GG. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice. *Development* 130:401-410.
24. Davies SJ, Wise C, Venkatesh B, Mirza G, Jefferson A, Volpi EV, Ragoussis J. 2004. Mapping of three translocation breakpoints associated with orofacial clefting within 6p24 and identification of new transcripts within the region. *Cytogenet Genome Res* 105:47-53.
25. de RN, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10972-10976.
26. de RN, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, Milgrom E. 1997. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med* 337:1597-1602.
27. Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatge MA, Bloom SR. 2005. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6609-6615.
28. Diaz E, Schimmoller F, Pfeffer SR. 1997. A novel Rab9 effector required for endosome-to-TGN transport. *J Cell Biol* 138:283-290.
29. Dode C, Hardelin JP. 2004. Kallmann syndrome: fibroblast growth factor signaling insufficiency? *J Mol Med (Berl)* 82:725-734.
30. Dode C, Hardelin JP. 2009. Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* 17:139-146.
31. Dode C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, Lespinasse J, Lienhardt-Roussie A, Mathieu M, Moerman A, Morgan G, Murat A, Toublanc JE, Wolczynski S, Delpach M, Petit C, Young J, Hardelin JP. 2006. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet* 2:e175.
32. Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, Jacobson-Dickman EE, Eliseenkova AV, Ma J, Dwyer A, Quinton R, Na S, Hall JE, Huot C, Alois N, Pearce SH, Cole LW, Hughes V, Mohammadi M, Tsai P, Pitteloud N. 2008. Decreased FGFR3 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest* 118:2822-2831.
33. Feather SA, Woolf AS, Donnai D, Malcolm S, Winter RM. 1997. The oral-facial-digital syndrome type 1 (OFD1), a cause of polycystic kidney disease and associated malformations, maps to Xp22.2-Xp22.3. *Hum Mol Genet* 6:1163-1167.
34. Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, Carrozzo R, Maestrini E, Pieretti M, Taillon-Miller P, Brown CJ, Willard HF, Lawrence C, Graziella PM, Camerino G, Ballabio A. 1991. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 353:529-536.
35. Giannandrea M, Bianchi V, Mignogna ML, Sirri A, Carrabino S, D'Elia E, Vecellio M, Russo S, Cogliati F, Larizza L, Ropers HH, Tzschach A, Kalscheuer V, Oehl-Jaschowitz B, Skinner C, Schwartz CE, Gecz J, Van EH, Raynaud M, Chelly J, de Brouwer AP, Toniolo D, D'Adamo P. 2010. Mutations in the small GTPase gene RAB39B are responsible for X-linked mental retardation associated with autism, epilepsy, and macrocephaly. *Am J Hum Genet* 86:185-195.
36. Gonzalez-Martinez D, Kim SH, Hu Y, Guimond S, Schofield J, Winyard P, Vannelli GB, Turnbull J, Bouloux PM. 2004. Anosmin-1 modulates fibroblast growth factor receptor 1 signaling in human gonadotropin-releasing hormone olfactory neuroblasts through a heparan sulfate-dependent mechanism. *J Neurosci* 24:10384-10392.
37. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA. 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145:4073-4077.
38. Groth C, Lardelli M. 2002. The structure and function of vertebrate fibroblast growth factor receptor 1. *Int J Dev Biol* 46:393-400.
39. Gunther T, Struwe M, Aguzzi A, Schughart K. 1994. Open brain, a new mouse mutant with severe neural tube defects, shows altered gene expression patterns in the developing spinal cord. *Development* 120:3119-3130.
40. Guran T, Tolhurst G, Bereket A, Rocha N, Porter K, Turan S, Gribble FM, Kotan LD, Akcay T, Atay Z, Canan H, Serin A, O'Rahilly S, Reimann F, Semple RK, Topaloglu AK. 2009. Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3633-3639.
41. Hardelin JP, Julliard AK, Moniot B, Soussi-Yanicostas N, Verney C, Schwanzel-Fukuda M, Yér-Le LC, Petit C. 1999. Anosmin-1 is a regionally restricted component of basement membranes and interstitial matrices during organogenesis: implications for the developmental anomalies of X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Dev Dyn* 215:26-44.
42. Hebert JM, Lin M, Partanen J, Rossant J, McConnell SK. 2003. FGF signaling through FGFR1 is required for olfactory bulb morphogenesis. *Development* 130:1101-1111.

43. Homanics GE, DeLorey TM, Firestone LL, Quinlan JJ, Handforth A, Harrison NL, Krasowski MD, Rick CE, Korpi ER, Makela R, Brilliant MH, Hagiwara N, Ferguson C, Snyder K, Olsen RW. 1997. Mice devoid of gamma-aminobutyrate type A receptor beta3 subunit have epilepsy, cleft palate, and hypersensitive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4143-4148.
44. Hu Y, Bouloux PM. 2010. Novel insights in FGFR1 regulation: lessons from Kallmann syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 21:385-393.
45. Hu Y, Gonzalez-Martinez D, Kim SH, Bouloux PM. 2004. Cross-talk of anosmin-1, the protein implicated in X-linked Kallmann's syndrome, with heparan sulphate and urokinase-type plasminogen activator. *Biochem J* 384:495-505.
46. Hudson ML, Kinnunen T, Cinar HN, Chisholm AD. 2006. *C. elegans* Kallmann syndrome protein KAL-1 interacts with syndecan and glypican to regulate neuronal cell migrations. *Dev Biol* 294:352-365.
47. Ibrahimi OA, Zhang F, Hrstka SC, Mohammadi M, Linhardt RJ. 2004. Kinetic model for FGF, FGFR, and proteoglycan signal transduction complex assembly. *Biochemistry* 43:4724-4730.
48. Inatani M, Irie F, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y. 2003. Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science* 302:1044-1046.
49. Jongmans MC, van Ravenswaaij-Arts CM, Pitteloud N, Ogata T, Sato N, Claahsen-van der Grinten HL, van der Donk K, Seminara S, Bergman JE, Brunner HG, Crowley WF, Jr., Hoefsloot LH. 2009. CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome--the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clin Genet* 75:65-71.
50. Kaser A, Winklmayr M, Lepperdinger G, Kreil G. 2003. The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep* 4:469-473.
51. Keramidas M, Faudot C, Cibiel A, Feige JJ, Thomas M. 2008. Mitogenic functions of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bombina variegata 8 on steroidogenic adrenocortical cells. *J Endocrinol* 196:473-482.
52. Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH, Kang GB, Rosenberger G, Tekin M, Ozata M, Bick DP, Sherins RJ, Walker SL, Shi Y, Gusella JF, Layman LC. 2008. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet* 83:511-519.
53. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le PE, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. 2001a. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276:34631-34636.
54. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le PE, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. 2001b. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276:34631-34636.
55. Kramer PR, Wray S. 2000. Novel gene expressed in nasal region influences outgrowth of olfactory axons and migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons. *Genes Dev* 14:1824-1834.
56. Kramer PR, Wray S. 2001. Nasal embryonic LHRH factor (NELF) expression within the CNS and PNS of the rodent. *Brain Res Gene Expr Patterns* 1:23-26.
57. Krsmanovic LZ, Mores N, Navarro CE, Arora KK, Catt KJ. 2003. An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2969-2974.
58. LeCouter J, Lin R, Tejada M, Frantz G, Peale F, Hillan KJ, Ferrara N. 2003. The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2685-2690.
59. LeCouter J, Zlot C, Tejada M, Peale F, Ferrara N. 2004. Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16813-16818.
60. Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, Claverie JM, Compain S, Wunderle V, Millasseau P, Le PD, Cohen D, Caterina D, . 1991. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 67:423-435.
61. Lin DC, Bullock CM, Ehler FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY. 2002. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 277:19276-19280.
62. Lin JC, Ho WH, Gurney A, Rosenthal A. 2003. The netrin-G1 ligand NGL-1 promotes the outgrowth of thalamocortical axons. *Nat Neurosci* 6:1270-1276.
63. Maggi CA, Schwartz TW. 1997. The dual nature of the tachykinin NK1 receptor. *Trends Pharmacol Sci* 18:351-355.

64. Maldonado-Perez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN. 2007. Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 18:66-72.
65. Mao X, Lillington D, Child F, Russell-Jones R, Young B, Whittaker S. 2002. Comparative genomic hybridization analysis of primary cutaneous B-cell lymphomas: identification of common genomic alterations in disease pathogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 35:144-155.
66. Mason AJ, Pitts SL, Nikolics K, Szonyi E, Wilcox JN, Seeburg PH, Stewart TA. 1986. The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy. *Science* 234:1372-1378.
67. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. 2004. Peripheral administration of metastatin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 320:383-388.
68. Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, Nagano M, Naito M, Soga T, Hiyama H, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M, Matsuo A, Ishii H, Kobori M, Katoh M, Matsushime H, Furuichi K, Shigeyoshi Y. 2006. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4140-4145.
69. Melchiorri D, Bruno V, Besong G, Ngomba RT, Cuomo L, De BA, Copani A, Moschella C, Storto M, Nicoletti F, Lepperdinger G, Passarelli F. 2001. The mammalian homologue of the novel peptide Bv8 is expressed in the central nervous system and supports neuronal survival by activating the MAP kinase/PI-3-kinase pathways. *Eur J Neurosci* 13:1694-1702.
70. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA. 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1761-1766.
71. Messina A, Ferraris N, Wray S, Cagnoni G, Donohue DE, Casoni F, Kramer PR, Derijck AA, Adolfs Y, Fasolo A, Pasterkamp RJ, Giacobini P. 2011. Dysregulation of Semaphorin7A/beta1-integrin signaling leads to defective GnRH-1 cell migration, abnormal gonadal development and altered fertility. *Hum Mol Genet* 20:4759-4774.
72. Miller NL, Wevrick R, Mellon PL. 2009. Necdin, a Prader-Willi syndrome candidate gene, regulates gonadotropin-releasing hormone neurons during development. *Hum Mol Genet* 18:248-260.
73. Miura K, Acierno JS, Jr., Seminara SB. 2004. Characterization of the human nasal embryonic LHRH factor gene, NELF, and a mutation screening among 65 patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH). *J Hum Genet* 49:265-268.
74. Mochizuki T, Kim J, Sasaki K. 2010. Microinjection of neuropeptide S into the rat ventral tegmental area induces hyperactivity and increases extracellular levels of dopamine metabolites in the nucleus accumbens shell. *Peptides* 31:926-931.
75. Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA. 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:107-137.
76. Monnier C, Dode C, Fabre L, Teixeira L, Labesse G, Pin JP, Hardelin JP, Rondard P. 2009. PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Hum Mol Genet* 18:75-81.
77. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2004. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 145:4565-4574.
78. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Nogueiras R, Vazquez MJ, Barreiro ML, Magni P, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2005. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 146:156-163.
79. Pask AJ, Kanasaki H, Kaiser UB, Conn PM, Janovick JA, Stockton DW, Hess DL, Justice MJ, Behringer RR. 2005. A novel mouse model of hypogonadotropic hypogonadism: N-ethyl-N-nitrosourea-induced gonadotropin-releasing hormone receptor gene mutation. *Mol Endocrinol* 19:972-981.
80. Pitteloud N, Acierno JS, Jr., Meysing A, Eliseenkova AV, Ma J, Ibrahimi OA, Metzger DL, Hayes FJ, Dwyer AA, Hughes VA, Yialamas M, Hall JE, Grant E, Mohammadi M, Crowley WF, Jr. 2006a. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6281-6286.
81. Pitteloud N, Durrani S, Raivio T, Sykiotis GP. 2010. Complex genetics in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Front Horm Res* 39:142-153.
82. Pitteloud N, Meysing A, Quinton R, Acierno JS, Jr., Dwyer AA, Plummer L, Fliers E, Boepple P, Hayes F, Seminara S, Hughes VA, Ma J, Bouloux P, Mohammadi M, Crowley WF, Jr. 2006b. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause Kallmann syndrome with a wide spectrum of reproductive phenotypes. *Mol Cell Endocrinol* 254-255:60-69.

83. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, Acierno J, Dwyer A, Plummer L, Hughes V, Seminara S, Cheng YZ, Li WP, Maccoll G, Eliseenkova AV, Olsen SK, Ibrahimi OA, Hayes FJ, Boepple P, Hall JE, Bouloux P, Mohammadi M, Crowley W. 2007a. Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest* 117:457-463.
84. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY, Crowley WF, Jr. 2007b. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17447-17452.
85. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. 2004. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432:226-230.
86. Prosser HM, Bradley A, Caldwell MA. 2007a. Olfactory bulb hypoplasia in Prokr2 null mice stems from defective neuronal progenitor migration and differentiation. *Eur J Neurosci* 26:3339-3344.
87. Prosser HM, Bradley A, Chesham JE, Ebling FJ, Hastings MH, Maywood ES. 2007b. Prokineticin receptor 2 (Prokr2) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:648-653.
88. Puverel S, Nakatani H, Parras C, Soussi-Yanicostas N. 2009. Prokineticin receptor 2 expression identifies migrating neuroblasts and their subventricular zone transient-amplifying progenitors in adult mice. *J Comp Neurol* 512:232-242.
89. Rance NE. 2009. Menopause and the human hypothalamus: evidence for the role of kisspeptin/neurokinin B neurons in the regulation of estrogen negative feedback. *Peptides* 30:111-122.
90. Robertson A, MacColl GS, Nash JA, Boehm MK, Perkins SJ, Bouloux PM. 2001. Molecular modelling and experimental studies of mutation and cell-adhesion sites in the fibronectin type III and whey acidic protein domains of human anosmin-1. *Biochem J* 357:647-659.
91. Saghatelian A, Roux P, Migliore M, Rochefort C, Desmaisons D, Charneau P, Shepherd GM, Lledo PM. 2005. Activity-dependent adjustments of the inhibitory network in the olfactory bulb following early postnatal deprivation. *Neuron* 46:103-116.
92. Sandoval-Guzman T, Rance NE. 2004. Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. *Brain Res* 1026:307-312.
93. Sato N, Katsumata N, Kagami M, Hasegawa T, Hori N, Kawakita S, Minowada S, Shimotsuka A, Shishiba Y, Yokozawa M, Yasuda T, Nagasaki K, Hasegawa D, Hasegawa Y, Tachibana K, Naiki Y, Horikawa R, Tanaka T, Ogata T. 2004. Clinical assessment and mutation analysis of Kallmann syndrome 1 (KAL1) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1, or KAL2) in five families and 18 sporadic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1079-1088.
94. Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. 1989. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res Mol Brain Res* 6:311-326.
95. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349:1614-1627.
96. Semple RK, Topaloglu AK. 2010a. The recent genetics of hypogonadotropic hypogonadism - novel insights and new questions. *Clin Endocrinol (Oxf)* 72:427-435.
97. Semple RK, Topaloglu AK. 2010b. The recent genetics of hypogonadotropic hypogonadism - novel insights and new questions. *Clin Endocrinol (Oxf)* 72:427-435.
98. Serra-Pages C, Medley QG, Tang M, Hart A, Streuli M. 1998. Liprins, a family of LAR transmembrane protein-tyrosine phosphatase-interacting proteins. *J Biol Chem* 273:15611-15620.
99. Silveira LF, MacColl GS, Bouloux PM. 2002. Hypogonadotropic hypogonadism. *Semin Reprod Med* 20:327-338.
100. Smith JT, Clifton DK, Steiner RA. 2006. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* 131:623-630.
101. Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, Kamohara M, Ohishi T, Matsushime H, Furuichi K. 2002. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1579:173-179.
102. Soussi-Yanicostas N, Hardelin JP, Mrozy-Jimenez MM, Ardouin O, Legouis R, Leveilliers J, Traincard F, Betton JM, Cabanie L, Petit C. 1996. Initial characterization of anosmin-1, a putative extracellular matrix protein synthesized by definite neuronal cell populations in the central nervous system. *J Cell Sci* 109 ( Pt 7):1749-1757.
103. Stachowiak MK, Maher PA, Stachowiak EK. 2007. Integrative nuclear signaling in cell development--a role for FGF receptor-1. *DNA Cell Biol* 26:811-826.

104. Sykietis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S, Dwyer AA, Quinton R, Hall JE, Gusella JF, Seminara SB, Crowley WF, Jr., Pitteloud N. 2010. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15140-15144.
105. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'Rahilly S, Semple RK. 2009. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 41:354-358.
106. Tornberg J, Sykietis GP, Keefe K, Plummer L, Hoang X, Hall JE, Quinton R, Seminara SB, Hughes V, Van VG, Van US, Crowley WF, Habuchi H, Kimata K, Pitteloud N, Bulow HE. 2011. Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:11524-11529.
107. Tostivint H. 2011. Evolution of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene family in relation to vertebrate tetraploidizations. *Gen Comp Endocrinol* 170:575-581.
108. Trarbach EB, Baptista MT, Garmes HM, Hackel C. 2005. Molecular analysis of KAL-1, GnRH-R, NELF and EBF2 genes in a series of Kallmann syndrome and normosmic hypogonadotropic hypogonadism patients. *J Endocrinol* 187:361-368.
109. Trarbach EB, Costa EM, Versiani B, de CM, Baptista MT, Garmes HM, de Mendonca BB, Latronico AC. 2006. Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4006-4012.
110. Trarbach EB, Silveira LG, Latronico AC. 2007. Genetic insights into human isolated gonadotropin deficiency. *Pituitary* 10:381-391.
111. Tsai PS, Moenter SM, Postigo HR, El MM, Pak TR, Gill JC, Paruthiyil S, Werner S, Weiner RI. 2005. Targeted expression of a dominant-negative fibroblast growth factor (FGF) receptor in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons reduces FGF responsiveness and the size of GnRH neuronal population. *Mol Endocrinol* 19:225-236.
112. Uetani N, Kato K, Ogura H, Mizuno K, Kawano K, Mikoshiba K, Yakura H, Asano M, Iwakura Y. 2000. Impaired learning with enhanced hippocampal long-term potentiation in PTPdelta-deficient mice. *EMBO J* 19:2775-2785.
113. Veugelers M, Vermeesch J, Reekmans G, Steinfeld R, Marynen P, David G. 1997. Characterization of glypican-5 and chromosomal localization of human GPC5, a new member of the glypican gene family. *Genomics* 40:24-30.
114. Volinia S, Dhand R, Vanhaesebroeck B, MacDougall LK, Stein R, Zvelebil MJ, Domin J, Panaretou C, Waterfield MD. 1995. A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J* 14:3339-3348.
115. Williams EO, Xiao Y, Sickles HM, Shafer P, Yona G, Yang JY, Lin DM. 2007. Novel subdomains of the mouse olfactory bulb defined by molecular heterogeneity in the nascent external plexiform and glomerular layers. *BMC Dev Biol* 7:48.
116. Wu S, Wilson MD, Busby ER, Isaac ER, Sherwood NM. 2010. Disruption of the single copy gonadotropin-releasing hormone receptor in mice by gene trap: severe reduction of reproductive organs and functions in developing and adult mice. *Endocrinology* 151:1142-1152.
117. Xu N, Kim HG, Bhagavath B, Cho SG, Lee JH, Ha K, Melicani I, Wenzel W, Podolsky RH, Chorch LP, Stackhouse KA, Grove AM, Odom LN, Ozata M, Bick DP, Sherins RJ, Kim SH, Cameron RS, Layman LC. 2011. Nasal embryonic LHRH factor (NELF) mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertil Steril* 95:1613-1620.
118. Yoshihara Y, Kawasaki M, Tamada A, Fujita H, Hayashi H, Kagamiyama H, Mori K. 1997. OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. *J Neurosci* 17:5830-5842.